ENGLISH LANGUAGE ABSTRACT FOR CN 1387442

Subaccount 12774-002001

Files searched:

Selected file: WPAT

Welcome to Derwent World Patent Index, (c) Derwent Information Ltd
UP (basic), UE(equiv), UA (poly), UB (chem) : updates thru 2005-05
Announcing availability of Fragmentation Code Enhancements: B,C,E,
Fragmentation codes harmonised for searching of the pre-1981 data.
For further details, contact your local Questel.Orbit help-desk.
Last database update : 2005/01/25 (YYYY/MM/DD)

1 / 1 WPAT - ©Thomson Derwent

Accession Nbr :
2001-246878 [26]
Sec. Acc. CPI :
C2001-074387
Title :
Oral vaccine based on recombinant Lactobacillus plantarum, useful for protecting against microbial pathogens and allergens, expresses heterologous antigen
Derwent Classes :
B04 D16
Patent Assignee :
(NEDE) NEDERLANDSE ORG TOEGEPAST
Inventor(s) :
LEER RJ; POUWELS P; SHAW DM; POUWELS PH
Nbr of Patents :
8
Nbr of Countries :
95
Patent Number :
EP1084709 A1 20010321 DW2001-26 A61K-039/00 Eng 19p *
AP: 1999EP-0203056 19990917
DSR: AL AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LT LU LV MC MK NL PT RO SE SI

WO200121200 A1 20010329 DW2001-26 A61K-039/00 Eng
AP: 2000WO-GB03575 20000918
DSNW: AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH CN CR CU CZ DE DK DM DZ EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TR TT TZ UA UG US UZ VN YU ZA ZW
DSRW: AT BE CH CY DE DK EA ES FI FR GB GH GM GR IE IT KE LS LU MC MW MZ NL OA PT SD SE SL SZ TZ UG ZW

EP1084709 A9 20010516 DW2001-28 A61K-039/00 Eng
AP: 1999EP-0203056 19990917
DSR: AL AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LT LU LV MC MK NL PT RO SE SI

AU200074337 A 20010424 DW2001-41 A61K-039/00
FD: Based on WO200121200
AP: 2000AU-0074337 20000918

EP1212083 A1 20020612 DW2002-39 A61K-039/00 Eng

FD: Based on WO200121200
AP: 2000EP-0962689 20000918; 2000WO-GB03575 20000918
DSR: AL AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LT LU LV MC MK NL PT RO SE SI

JP2003509469 W 20030311 DW2003-19 A61K-039/00 61p
FD: Based on WO200121200
AP: 2000WO-GB03575 20000918; 2001JP-0524624 20000918

CN1387442 A 20021225 DW2003-24 A61K-039/00
AP: 2000CN-0815334 20000918

ZA200201969 A 20030827 DW2003-62 A61K-000/00 67p
AP: 2002ZA-0001969 20020308

Priority Details :
1999EP-0203056 19990917

IPC s :
A61K-000/00 A61K-039/00 A61K-035/74 A61K-048/00 A61P-031/04 A61P-031/10 A61P-031/12 A61P-033/02 A61P-037/08 C12N-001/21 C12N-015/09 C12N-015/74 C12R-001:25

Abstract :
EP1084709 A
NOVELTY - An oral vaccine (A) containing a recombinant lactic acid bacterium that expresses a heterologous antigen (Ag) in vivo, intracellularly and/or at the cell surface, as the immunogenicity-eliciting component (the bacterium used is Lactobacillus plantarum), is new.
DETAILED DESCRIPTION - INDEPENDENT CLAIMS are also included for the following:
(a) a recombinant L. plantarum (strain 256), for use in the vaccines; and
(b) an expression vector for intracellular expression and exposure of Ag by L. plantarum under the conditions that exist in the gastrointestinal tract.
ACTIVITY - Virucide; antimicrobial; anti-allergic; fungicide; protozoacide.
MECHANISM OF ACTION - Vaccine; induction of a specific immune response. L. plantarum containing the plasmid pLP503-TTFC (expressing intracellularly the TTFC tetanus antigen) was administered orally (5 multiply 109 cells) to mice. Following two booster doses, the TTFC-specific antibody titer increased to 103 by day 77.
USE - (A) are used to protect against:
(i) a wide range of bacteria, viruses, fungi and protozoa, especially those that colonize the mucosa or gastrointestinal tract; and
(ii) allergens.
ADVANTAGE - The vaccines can be administered safely to all humans, including infants, the elderly and immunocompromised subjects. L. plantarum colonizes at least part of the gastrointestinal tract (particularly the small intestines), has good persistence and provides higher-level expression of Ag compared with L. casei. L. plantarum is generally recognized as safe and is particularly a food-grade strain. The recombinant L. plantarum persists for over 5, especially 20, days, i.e. longer than L. plantarum 80 and preferably longer than strain NCIMB 8826 under the same conditions.(Dwg.0/0)

Manual Codes :
CPI: B04-B04C B04-B04L B04-C01 B04-E02 B04-E02F B04-E03 B04-E03F B04-F1000E B04-G07 B04-G08 B04-G09 B04-N04 B04-N0400E B11-A01 B11-C07A B11-C08E B11-C09 B12-M07 B14-A01 B14-A02 B14-A03 B14-A04 B14-B01 B14-S11 D05-C12 D05-H04 D05-H07 D05-H08 D05-H11 D05-H12 D05-H14A1 D05-H17A5 D05-H17B5 D05-H18

Update Basic :
2001-26

Update Basic (Monthly) :

2001-05

Update Equivalents :

2001-26; 2001-28; 2001-41; 2002-39; 2003-19; 2003-24; 2003-62

Update Equivalents (Monthly) :

2001-05; 2001-07; 2002-06; 2003-03; 2003-04; 2003-09

[19]中华人民共和国国家知识产权局

D1

[51]Int. Cl[7]
A61K 39/00
C12N 15/74

[12]发明专利申请公开说明书

[21]申请号 00815334.5

[43]公开日 2002年12月25日

[11]公开号 CN 1387442A

[22]申请日 2000.9.18 [21]申请号 00815334.5
[30]优先权
[32]1999.9.17 [33]EP [31]99203056.9
[86]国际申请 PCT/GB00/03575 2000.9.18
[87]国际公布 WO01/21200 英 2001.3.29
[85]进入国家阶段日期 2002.5.8
[71]申请人 荷兰应用自然科学研究组织
地址 荷兰德尔夫特
[72]发明人 D·M·肖 R·J·莱尔
P·普维尔斯
[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 姜建成

权利要求书4页 说明书38页 附图2页

[54]发明名称 口服重组乳杆菌疫苗

[57]摘要

描述了用于疫苗的重组或修饰乳杆菌属(Lactobacillus)细菌。所述细菌在细胞内或在所述细菌的表面表达异源抗原,并将引发免疫应答。所述疫苗适于口服给予。优选的细菌是植物乳杆菌(Lactobacillusplantarum),尤其是植物乳杆菌256。

ISSN1008-4274

1. 一种包含重组乳酸细菌的口服疫苗，所述重组乳酸细菌能够在细胞内和/或在所述细菌的表面上表达异源抗原，其中所述细菌是植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)而且能够激发针对所述异源抗原的免疫应答和/或免疫原性。

2. 依照权利要求 1 的疫苗，其中所述重组植物乳杆菌包含能够在细胞内表达所述异源抗原和/或在细胞表面暴露性表达所述异源抗原的表达载体，任选所述表达在胃肠道内的条件下进行。

3. 依照权利要求 1 或 2 的疫苗，其中所述异源抗原能够诱导针对致病微生物、任选针对粘膜定居病原体特异性异源抗原或通过粘膜例如经口途径进入体内的病原体特异性异源抗原的免疫原性。

4. 依照前述权利要求中任一项的疫苗，其中所述异源抗原诱导针对定居在胃肠道的致病微生物的免疫原性。

5. 依照前述权利要求中任一项的疫苗，其中所述致病微生物是：疱疹病毒、风疹病毒、流感病毒、腮腺炎病毒、麻疹病毒、脊髓灰质炎病毒、轮状病毒、呼吸道合胞病毒、弯曲杆菌属(*Campylobacter*)细菌、衣原体(*Chlamydial*)属生物、*Cryptosporidium* 属物种、巨细胞病毒、人类免疫缺陷病毒、放线菌属(*Actinomyces*)细菌、溶组织内阿米巴(*Entamoeba histolytica*)、沙粒病毒、虫媒病毒、肉毒梭菌(*Clostridium botulinum*)、假丝酵母属(*Candida*)真菌、霍乱弧菌(*Vibrio cholera*)、新型隐球酵母(*Cryptococcus neoformans*)、大肠杆菌 O157:H7、O26:H11、O111:H8 和 O104:H21 的 EHEC 株、大肠杆菌 ETEC 株、显示具有肠侵袭性的大肠杆菌菌株(EIEC)、大肠杆菌的 EPEC 株、大肠杆菌的 EAggEC 株、大肠杆菌的 DAEC 株、线状病毒科、细小病毒、丝虫目(*Filarioidea*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)属细菌、幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)、杯状病毒、兰伯氏贾第虫(*Giardia lamblia*)、淋病奈瑟氏球菌(*Neisseria*

gonorrhoeae)、汉坦病毒属、甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、丁型肝炎病毒、戊型肝炎病毒、军团菌属(*Legionellae*)菌株、麻风分枝杆菌(*Mycobacterium leprae*)、单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)、产气荚膜梭菌属细菌、布氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)、类鼻疽伯克霍尔德氏菌(*Pseudomonas pseudomallei*)、EB病毒、旋盘尾丝虫(*Onchocerca volvulus*)、痘病毒、百日咳杆菌(*Bordetella pertussis*)、鼠疫耶尔森氏菌(*Yersinia pestis*)、伯纳特氏柯克斯氏体(*Coxiella brunetti*)、狂犬病病毒、苍白密螺旋体(*Treponema pallidium*)、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*)、引起疟疾的真核寄生虫、肺炎卡氏肺囊虫(*Pneumocystis pneumonia*)、以及引起弓形体病的媒介，以及上述致病微生物的组合。

6. 依照任一项前述权利要求的疫苗，所述疫苗激发针对轮状病毒、呼吸道合胞病毒、结核分枝杆菌、人类免疫缺陷病毒、大肠杆菌、霍乱弧菌、链球菌和或衣原体的保护性应答。

7. 依照前述权利要求中任一项的疫苗，其中所述异源抗原是一种病毒抗原和/或细菌抗原，任选为 HIV 病毒的(gp160)包膜蛋白、利什曼原虫属(*Leishmania*)寄生虫表面糖蛋白、志贺样毒素、志贺菌属(*Shigella*)脂多糖抗原、大肠杆菌菌毛抗原、产肠毒素的大肠杆菌菌株的 CFA 抗原、炭疽毒素、百日咳毒素、破伤风毒素。

8. 依照权利要求 1-4 中任一项的疫苗，其中所述异源抗原是一种人类变态反应原或所述异源抗原是破伤风特异性异源抗原。

9. 依照前述权利要求中任一项的疫苗，所述疫苗可以诱导保护性免疫原性。

10. 依照前述权利要求中任一项的疫苗，所述疫苗配制为单剂量疫苗。

11. 依照前述权利要求中任一项的疫苗，其中所述重组植物乳杆菌在细胞内和/或在细胞表面表达所述异源抗原，其表达程度超过植物

乳杆菌 80 表达β-半乳糖苷酶的程度。

12. 依照前述权利要求中任一项的疫苗，其中所述重组植物乳杆菌包含同源表达和/或分泌信号，所述同源表达和/或分泌信号任选为用于乳杆菌、优选植物乳杆菌的表达载体的同源表达和/或分泌信号。

13. 依照前述权利要求中任一项的疫苗，其中所述重组植物乳杆菌菌株保持(在接种个体内)5 天以上、最好 9 天以上、优选 15 天以上甚至 20 天。

14. 依照前述权利要求中任一项的疫苗，其中所述重组植物乳杆菌在同等条件下比植物乳杆菌 80 保持更长时间、最好比植物乳杆菌 NCIMB 8826 保持更长时间。

15. 依照前述权利要求中任一项的疫苗，所述疫苗配制用于给予人类，例如婴儿、无免疫应答的人、老人或正常健康婴儿、儿童或成人。

16. 依照前述权利要求中任一项的疫苗，其中所述重组植物乳杆菌是重组植物乳杆菌 256。

17. 依照前述权利要求中任一项的疫苗，其中所述疫苗包含至少一种佐剂或药学上可接受的载体。

18. 一种前述任一项疫苗权利要求定义的重组植物乳杆菌，所述重组植物乳杆菌任选为植物乳杆菌 256 的重组菌株。

19. 依照权利要求 18 的细菌，所述细菌是非人类来源的细菌。

20. 一种非人类来源和/或非人类食品来源的乳杆菌属细菌，所述乳杆菌属细菌已进行修饰以表达异源抗原并在个体内激发免疫应答。

21. 依照权利要求 20 的细菌，其中：

(a) 所述天然或未修饰的植物乳杆菌对于所述个体是外源性的或者不存在于人类胃肠道或粘膜内；

(b) 所述抗原在细胞内和/或在细胞表面上表达；和/或

(c) 所述抗原是一种免疫原。

22. 一种乳杆菌属细菌，所述乳杆菌属细菌已进行修饰以在细胞

内和/或在细胞表面上表达异源抗原，并在个体内激发免疫应答，并且所述乳杆菌属细菌能够在所述个体的胃肠道内保持至少 7 天。

23. 依照权利要求 18 至 22 中任一项的乳杆菌属细菌，所述乳杆菌属细菌是植物乳杆菌或者是用于疫苗的乳杆菌属细菌。

24. 一种适用于细胞内表达或暴露(在细胞表面上)性表达外源抗原的表达载体，所述表达载体能够在胃肠道内条件下在植物乳杆菌内表达所述异源抗原。

25. 依照权利要求 19 至 24 中任一项的细菌，所述细菌用于人类或动物体的预防或治疗方法。

26. 一种乳杆菌属细菌用于生产疫苗的用途，所述乳杆菌属细菌已经进行修饰，从而在细胞内和/或在所述细胞表面表达异源抗原，所述疫苗用于未修饰的植物乳杆菌对其是外源性的个体。

27. 依照权利要求 26 的用途，其中所述未修饰的乳杆菌属细菌是植物乳杆菌、不存在于人类(所述菌株是内源性的)或不存在于哺乳动物胃肠道或粘膜。

28. 依照权利要求 19 至 24 中任一项的细菌的用途，所述细菌用于生产疫苗。

29. 依照权利要求 28 的用途，其中所述疫苗适合口服给予和/或给予时激发免疫应答。

30. 依照权利要求 26 至 29 中任一项的用途，所述应用是用于治疗或预防破伤风。

口服重组乳杆菌疫苗

发明概要

本发明属于疫苗开发领域。具体地说，本发明涉及口服疫苗开发。本发明涉及使用重组非致病菌作为口服应用后能够引发免疫应答的抗原的载体。更具体地说，本发明包括使用乳杆菌属(*Lactobacillus*)的乳酸细菌。所涉及的乳酸细菌在分类学上为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)。所述抗原在所述乳酸杆菌细胞内表达和/或暴露于表面。由于所述疫苗使用活微生物作为抗原的载体，因此所述疫苗是活疫苗。本发明还包括新型重组植物乳杆菌以及其中使用的表达载体。

发明背景

一段时间以来，技术人员一直对这样的设计思想感兴趣：即发展基于非致病载体的口服疫苗，而不是使用目前商业化应用的减毒致病微生物如鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)和牛分枝杆菌(*Mycobacterium bovis*)。发展这样的减毒株是慢长耗时的。这需要发展由于去除了致病性而对环境或个体没有危险的重组菌株。然而它们必须保持免疫原性，以便可以产生保护性免疫应答。另外一个问题是发展遗传性稳定重组菌株。使用原先致病的微生物存在这样的风险：对于所述载体本身的免疫应答会降低加强疫苗的效能，因为如果疫苗接种者已经接触过所述载体细菌，那么已经存在的抗体会造成这样的情况。最后，使用部分毒力载体株的个体群比使用其它载体系统时的风险更大。包括婴儿、老人和无免疫应答的个体。简而言之，长时间以来人们一直觉得需要安全有效的疫苗。

粘膜疫苗，即使用粘膜传递途径的疫苗，看起来比使用系统接

种有若干好处。它们可以用于产生作为第一线防御的 IgA 型免疫应答。对粘膜感染的保护性免疫应答极大依赖于分泌型 IgA 分子的产生。这样的分子局部产生，并被转运到粘膜分泌产物中。

另一类可能有用的粘膜疫苗旨在通过所述疫苗的粘膜应用而不是胃肠外应用，诱导系统性免疫应答。理想状况下，所述免疫应答应该相当于足够有效的胃肠外疫苗所诱导的免疫应答。

然而，刺激粘膜免疫系统时，系统性应用抗原可能不起作用，或作用不可靠。不幸的是，特定抗原的口服给予通常也不导致足够的免疫应答，即使最终它导致某些应答。这是由于所述抗原在胃肠(G.I.)道中的吸收差和快速降解，以及对宿主的耐受性诱导。因此在过去提出了替代方案。

在尝试过的选择中，包括产生保护性载体系统如 iscom、微球体和脂质体，以及使用无害的活微生物在体内局部产生(即在体内原位)所需的抗原。

在寻找用作抗原载体的无害微生物群时，乳酸细菌群看起来是合适的细菌。它们在食品生产技术中大规模应用。它们构成适于人类应用的一群食品级(即通常是 GRAS 状态)格兰氏阳性微生物。它们在食品中有大量安全使用的记录。在它们的好处中另一个有趣的方面当然是它们不含 LPS(LPS 存在于目前用作载体的一些致病微生物中)。这样，由于预期它们没有关于内毒素性休克风险的问题，因此它们对于通过粘膜途径应用显然是安全的。

此外，由于乳酸细菌能够定居(即能够居留和或生长)在诸如口腔、尿生殖道或胃肠道的腔道中，在这些部位它们的作用是维持正常微生物区系的平衡，因此它们作为益生菌进行生产。然而，目前没有商业化使用非致病细菌的口服疫苗。

在粘膜疫苗领域中，一方面人们必须区分鼻(以及阴道)疫苗，另一方面必须区分口服疫苗。口服抗原所面临的环境比鼻环境恶劣得多。此外，已经证实，能够在鼻应用中引发免疫应答的疫苗在口服

应用时是不成功的。已经提出了使用非致病载体的鼻疫苗，但由于没有预期的特性或效能，无助于开发口服疫苗面临的问题。例如，已有关于使用重组干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)和植物乳杆菌菌株作为鼻疫苗或在鼻疫苗中使用它们的介绍，这两种细菌对于该给予途径同样适合。令人惊讶的是，在本发明中已经发现植物乳杆菌株适于用作口服疫苗或用于口服疫苗中。与此不同-下文进一步讨论，本领域还未能就其它乳杆菌菌株获得相似的结果，例如已经建议用作鼻疫苗的干酪乳杆菌 (Pouwels 等, J. Biotech. 1996 44: 183-192; Pouwels 等, Int. J. Food Microbiol. 1998 41: 155-167)。

现有技术领域认为是潜在合适的乳酸细菌型疫苗有 3 类。其中两类用作口服疫苗看起来是潜在可行的。第一类是基于乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)的疫苗，第二类是基于格氏链球菌(*Streptococcus gordonii*)的疫苗。关于这两类的各种优点和缺点有详细文献介绍(Mercenier A., 载于 Probiotics: A critical review, Horizon Scientific Press, Wymondham, U.K. 1999, 第 113-127 页; Pouwels 等, Int. J. Food Microbiol. 1998 41: 155-167)。

第三类是基于乳杆菌的疫苗，包括经鼻引入的能够引发免疫应答的重组乳杆菌。然而，目前仍然没有口服引入的重组乳杆菌确实引发免疫应答。而有推测性公开的重组非致病细菌，该菌在体内表达异源抗原，口服应用时产生显著的免疫应答。

一项研究公开了一个不成功的试验，该试验涉及将在细胞内表达异源抗原的重组乳杆菌口服引入小鼠体内(Wells 等, Antonie van Leeuwenhoek 1996 70: 317-330)。第 0 天、第 1 天和第 2 天在小鼠中口服引入在细胞内表达大肠杆菌(*E. coli*) β-半乳糖苷酶的植物乳杆菌 80。间隔 4 周后进行随后的口服加强。该试验揭示：没有对所述 β-半乳糖苷酶(异源抗原)的显著抗体应答，而所述 β-半乳糖苷酶未知其任何免疫原性特性。这项结果与腹膜内结果相反，腹膜内实验使用同样的细菌菌株、同样的抗原和同样的表达系统，获得了免疫应

答。可以提出该失败的各种解释，但目前没有一个解释能够阐明为什么口服接种没有好的结果。

其它技术提到重组植物乳杆菌的潜在用途。WO99/11284 提出，可以使用乳酸细菌产生口服疫苗。所建议的实施方案看起来是其中可溶性蛋白从所述重组微生物中分泌出来的一个方案。所述文献中没有提到表面暴露或细胞内产生，并且推测性地提出许多种可能有用的乳酸细菌。建议的细菌是德氏乳杆菌(*Lactobacillus delbruekii*)、干酪乳杆菌、发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)、植物乳杆菌、类植物乳杆菌(*Lactobacillus paraplatarum*)、戊糖乳杆菌(*Lactobacillus pentosus*)、棒状乳杆菌(*Lactobacillus coryniformis*)、短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)、希莱曼氏乳杆菌(*Lactobacillus leichmannii*)以及从肠菌群中分离出来的乳杆菌属菌株如鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*) *901*。后者被指出是尤其优选的乳酸细菌，因为它对酸液和胆汁均具有抗性。在所述实施例中提到的乳酸细菌是植物乳杆菌 8826 (3×10^9 细菌/ml，每天两次，持续 18 天)。

按照 WO99/11284 的乳酸细菌应当产生脲酶作为异源抗原。没有建议其它抗原，也没有提供成功诱导体内免疫应答的例证。关于这一点推测性说明的实施例在本质上仅仅是推测性的，并且没有提供实际的结果。另外它提示：所述抗原(脲酶)由所述细菌宿主分泌入周围环境中成为“游离的”可溶性蛋白(即不暴露于所述细菌宿主的表面或以其它方式与所述细菌宿主表面相连接)。

事实上，对于所述假设的方法是否能成功地提供免疫应答，存在很大怀疑。许多文章已经公开地指出可溶性蛋白的分泌不可能诱导免疫应答：因此，不可能有合适的技术以提供有用的口服疫苗。这一点加上缺少任何实验数据，看起来证明了没有使用乳酸杆菌作为宿主的口服疫苗的可能性。充其量它是以治疗幽门螺杆菌(*Heliobacter pylori*)相关疾病为目的，推测性公开使用分泌脲酶可溶性蛋白作为异源抗原的乳杆菌。对于预期具有特定问题的其它抗原，

则没有公开任何事实，所述特定问题如它们在口腔介质/胃肠介质的腐蚀性环境下存活的不可预见性。

综述文章(Mercenier, 1999)描述了引入植物乳杆菌 NCIMB 8826(一种人类唾液分离物)的表达异源抗原(如 TTFC)的各种构建物。对于所有这些重组乳杆菌构建物，在小鼠中的经鼻引入都导致免疫应答。此外，该文章指出已经进行了口服测试以进行比较，但没有提供所述口服实验的结果，也没有指出所述抗原在细胞的哪一部分表达。因此，该文章也没有提到任何、某些或全部所述构建物是否产生了任何显著的免疫应答。缺乏数据再加上由鼻疫苗到口服疫苗的数据进行推断的一般知识，以及以前使用乳杆菌作为口服疫苗的失败，看起来是无法成功的。当然一般的解释是预期成功的理由不充分。

相似的情况也出现在一份来自 Mercenier 集团(Institut Pasteur, Lille: Grangette 等, Immunology letters, 69(1): No. 1, 第 176 页: 45.13)的摘要，在这份摘要中没有给出数据以支持免疫的主张。

该结论得到 Pouwels 等 1998 的支持，Pouwels 等报道在干酪乳杆菌中的表达载体如何获得异源抗原的良好表达，但在口服引入后仅提供了相当低水平的抗体。这可能是由于干酪乳杆菌的生存力差，但这个因素没有得到进一步的研究，并且对于所述重组干酪乳杆菌不能获得保护性免疫应答存在多种其它原因。例如，体内表达量可能太低以致于不能真正激发免疫应答，或者所述抗原没有按照使其能引发免疫应答的方式呈递。

在实现本发明的实验中，包括重组干酪乳杆菌以作为本发明的植物乳杆菌疫苗的比较。证实作为异源抗原的体内载体的基于干酪乳杆菌的表达系统无效。这项发现质疑 WO99/11284 公开的内容，因为该发明提示干酪乳杆菌可以作为有用载体的一个例子。

为进一步支持在这个领域内在物种间的数据外推并不总是可靠的，以前的实验已经比较了重组植物乳杆菌和非重组干酪乳杆菌的

引发佐剂活性。证实干酪乳杆菌是引发体内佐剂活性的最佳微生物。因此，人们推测干酪乳杆菌是用于疫苗的比植物乳杆菌或任何其它乳酸细菌菌株更优选的候选者。

发明描述

本发明的第一方面是包含表达异源抗原(适合体内表达)的重组乳酸细菌的一种(如口服)疫苗。所述抗原可以在所述乳酸细菌细胞内表达和/或表面(暴露)表达。因此，所述疫苗可以成为特异性免疫原性引发成分，用于引发针对所述异源抗原的免疫原性，或者所述疫苗可以引发(免疫)应答。所述重组乳酸细菌最好是乳杆菌属细菌，如植物乳杆菌，并且可选地存在至少一种适于用于口服传递的制剂中的药学上可接受的载体。

在本说明书中，除特别指出外，下文中提到的术语和词组具有下面的含义。

“细菌宿主”指用于表达所需抗原(如通过重组技术)的细菌或细菌菌株。它作为疫苗或作为疫苗的组成部分给予人体或动物(哺乳动物)，以引发针对所述抗原的免疫应答。该术语用于表示转化表达所述抗原的天然菌株、表达所述抗原的重组菌株(也独立地称为“重组宿主菌株”)、或所述二者。

疫苗的“粘膜传递(途径)”是指不需要透过或刺穿皮肤(例如静脉内给予、肌肉内给予、皮下给予或腹膜内给予)给予人体或动物体的任何给药途径。通常这意味着所述疫苗通过一个体腔给予机体，以便它与粘膜相接触。因此，粘膜给予尤其是指鼻给予、口服给予和/或阴道内给予。

“粘膜疫苗”是指任何适于、改变后用于、预定用于和/或配制用于粘膜传递的疫苗。

(疫苗的)“口服传递(途径)”是指通过该途径所述疫苗可以呈递到人类或动物胃肠道(G. I.)或其任何部分达的任何传递途径。通常包

括给予到胃肠道或通过口腔给予到胃肠道。“口服给予”也包括例如使用管或导管直接给予到胃肠道或其任何部分，包括给予到胃。

“口服疫苗”是指任何适于、改变后用于、预定用于和/或配制用于上文所定义的口服传递的疫苗。

假如一种应答(如抗体应答或免疫应答)导致人体或动物体内可检测的改变或反应，尤其是可检测到的免疫改变或免疫反应，如抗体、细胞因子、淋巴因子的产生等等，则这种反应就被认为是“显著的”。确定一种应答是否是“显著的”的测试是本领域内已知的，包括但不限于：使用 ELISA 技术、ELISPOT 技术以及体外淋巴细胞刺激测试来滴定生物学样品中的抗体水平。通常在从人类或动物获得的生物样品如生物体液或细胞样品上实施这样的技术。

一种“显著的”应答同时也可以是、但不一定是如下文所定义的“保护性”应答。当一种应答(如针对病原体或抗原的免疫应答)能够保护具有这种反应的人类或动物对抗所述病原体和/或对抗与所述抗原有关的病原体时，这种反应就被认为是“保护性”的。

当一种抗原在细菌宿主的表面(如细菌细胞壁或被膜)上存在、构成其组成部分、附着和/或以其它方式连接或可检测到(如使用合适的免疫学检测技术如 FACS 或免疫荧光显微术)时，就认为该抗原“暴露”(也称为所述抗原的“(表面)暴露”)在所述细菌宿主上。

“暴露的”最好是指所述细菌当以足够时间和足够量呈递到人类或动物能够介导免疫应答的细胞(如下文提到的胃肠道细胞)时，能够引发针对所述抗原的“足够”免疫应答。

细菌菌株

使用已知参数可以容易地鉴定植物乳杆菌菌株(如 Bergeys Manual of determinative bacteriology 和 Vescovo 等, Ann. Microbiol. Enzymol. 43 261-284 (1993))。因此技术人员可以容易地鉴定一种乳酸细菌是否是植物乳杆菌。在不同机构已经保藏了多种植物乳杆菌菌

株，并且这些菌株是容易获得的。

选定作为细菌宿主的天然菌株应当最好是 GRAS (一般认为是安全的)状态，并且更优选是食品级的。

另外，所使用的细菌宿主在用编码抗原的合适构建物转化时，应当允许所需抗原在细胞内表达和/或表达的抗原暴露在表面上。

根据 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳或 FACS 测定，所述抗原表达(如在细胞内和/或暴露在表面)的水平最好应当至少占总细胞蛋白的 1-5%，或者是植物乳杆菌菌株 256 在同样条件、使用同样表达载体所提供的表达水平的 80%或更多、最好 100%或更多。

此外，所述细菌宿主最好能够居留在和/或定居在至少部分胃肠道，如口腔、咽、喉、肠、小肠、大肠、回肠和/或结肠，或它们的组合。所述细菌宿主最好是这样的：它主要居留在肠内，更优选居留在小肠或盲肠内。

所述(重组)植物乳杆菌菌株最好在需要免疫的个体内保持至少 5 天(在口服给予时，并且根据该菌株在粪便中的存在确定)，至少 9 天，合适的是多于 15 天甚至 20 天。假如如下所述，给予方案包括使用一次或多次加强免疫，则不需要更长的持续性。

优选的实施方案显示在同等条件下比植物乳杆菌 80 保持更长、最好比植物乳杆菌 NCIMB 8826 保持更长。这可以小鼠胃肠道客观地评估，所述小鼠最好是同样年龄并且处于同等治疗条件下，虽然可选择条件。

所述植物乳杆菌菌株最好不是 LMG 9211 (以上 Mercinier 称为 NCIMB8826)、DSM 4229 干酪乳杆菌 393、和/或植物乳杆菌 80。所述细菌宿主最好是下面植物乳杆菌菌株中的一种：256、LMG 1284、LMG 6907、LMG 8155、LMG 9205、LMG 9206、LMG 9208、LMG 9209、LMG 9210、LMG 9212、LMG 11405、LMG 11460、LMG 8095、LMG 8027、LMG 12167、LMG 13556、LMG 17552、LMG 18021、LMG 18023、LMG 18024、LMG 18027、LMG 18095；386、299、105

或 275(见 Molin 等，1993. J. Appl. Bacteriol. 74: 314)、299v(见 WO96/29083); So5、36^{E}、95、120 或 44(见 Johannson 等 1995, Int. J. Syst. Bacteriol, 第 45 卷(4): 670-675)、79、107、98、53、97、101 或 125(见 Johansson 等 1995, Int. J. Food. Micro. 25: 159)、CH、ATCC 8041、ATCC 10012、ATCC 10776、WCFS、DF66 IIIa、DF66spez.-IVa 和/或可以从日本微生物保藏中心获得的下列保藏号的植物乳杆菌菌株：8341、8342、8343、8344、8345、8346、8347 和/或 8348。

所使用的乳杆菌属细菌最好对于所给予(例如接种)的个体(人类或动物)是外源性的。本发明的细菌是修饰或重组细菌，因此所述野生型或天然细菌(即非重组或未修饰的乳杆菌属细菌)最好是外源性的。因此外源性是指个体(或人类)以前没有接触过的乳杆菌属菌株。换句话说，优选使用非人类来源的乳杆菌属菌株，例如没有在人体内发现过或存在的菌株。所述菌株最好是一种没有在人类或动物中发现过的菌株，例如在肠(胃肠道)中不存在的菌株。这样的菌株将引起更显著或更大的免疫应答。因此虽然以前的工作者使用从人体得到的植物乳杆菌菌株(例如 NCIMB 8826，一种人类唾液分离物)，本发明的发明人采用了一种反直觉的方法，寻找在人体内不存在的菌株。

例如，在先工作者已经使用保藏号为 NCIMB 8826 的植物乳杆菌菌株。该菌株在人体内发现，例如它已经存在于胃肠道内。这意味着它不可能引起或引发象对人类是外源(或不存在于人体内)的乳杆菌属菌株那样好的免疫应答。

因此，本发明最好使用没有在个体的粘膜(非粘膜)或胃肠道中发现的乳杆菌属菌株，例如它不是内源性的(对于需要接种的人类或动物物种)。实际上，最优选法的菌株(如植物乳杆菌 256)存在于青贮饲料。这样的菌株对于人类明显是外源性的，因此提供增强的免疫应答。然而，所述菌株最好能够附着到肠粘膜上。

所述菌株也可以是非食品来源的，例如未在(人类)食品中发现。

这样就可以排除一些干酪乳杆菌菌株，如 393。菌株 393 在奶酪中发现，因此最好排除在乳制品或发酵制品中发现的菌株。这意味着个体不曾(或可能不曾)曾经接触(例如摄取)过所述菌株，因此使用没有在食物中发现的菌株更有可能引起免疫应答。这可以解释为什么某些乳酸杆菌保持时间长。可能由于这些细菌不被免疫系统所识别，因此它们清除更慢。因此，适当的是，所述菌株是动物来源细菌，例如来自动物饲料(如青贮饲料)。一般更合适的菌株是共生细菌(肠道内)，而不是与饮食有关的细菌(如乳制品来源)。

所述乳杆菌属菌株最好是活的并且是完整的。它们最好能够在个体内(在粘膜内)持续至少 7 天。这可以使用本领域内已知的程序容易地检测(例如，检测所述生物在粪便中的存在情况)。

因此，本发明还涉及非人类来源和/或非人类食物来源的乳杆菌属细菌，例如植物乳杆菌，其中已经修饰所述细菌以表达异源抗原(在细胞内和/或在细胞表面)。该细菌最好能在所要给予的个体内引发免疫应答。因此，天然存在或未修饰的植物乳杆菌最好对于所述个体是外源性的，例如它对于所要给予的人类或动物不是内源性的。所述选定的植物乳杆菌菌株最好不存在于人类或该动物物种的胃肠道或粘膜内。

本发明还涉及已经经过修饰而在细胞内和/或在细胞表面上表达异源抗原、从而在个体内引发免疫应答，并且在该个体的胃肠道内保持至少 7 天的植物乳杆菌细菌。

技术人员可以根据一种或多种以下特性或因素选择其它合适的菌株:

- 编码所述抗原的构建物在所选定的细菌宿主中的稳定性；抗原在所选定的细菌宿主中的表达水平；抗原表达在所选定的细菌宿主中的调节；抗原在所选定的细菌宿主中的表达位点；和/或所产生的抗原的稳定性；
- 所使用的菌株的生物化学特性，例如其糖发酵概况(API)、细

胞壁组成、LTA 结构、肽聚糖结构、16S RNA 序列、酸抗性、胆汁酸抗性、凝集特性、佐剂活性、免疫调节特性、体外附着特性、甘露糖特异性附着、蛋白质类附着因子的存在、mapA 样附着因子的存在和/或具有重复氨基酸序列的大蛋白质类附着因子的存在；和/或

- 所述细菌宿主与所述宿主(作为按照本发明的疫苗的一部分)所要给予的个体的细胞的相互作用，包括但不限于它的持续性、生存力、抗原的体内表达和/或组织特异性持续性。

在至少一些、最好大多数、更优选基本上全部这些特性中，例如根据本领域内针对已知的这些特性本身的测试/测定进行的测定，所使用的菌株应当基本(至少)等同于上文所提到的菌株，更优选等同于植物乳杆菌 256。在选出合适的宿主后，可以用如本文所述的遗传构建物对其进行转化，然后测试其作为口服疫苗的适合性，即使用在下面的实施例中描述的测试和方法。预计在本文的描述的基础上，并可选地进行本文所述的测试(目的是证实实施方案)后，技术人员将能够鉴定适于用作或用在本发明的疫苗中的其它植物乳杆菌菌株。

所述植物乳杆菌最好是属于 1 群(或簇)(包括菌株 101、97、53、256、ATCC 14917、36^E、95、98、299、299v、107、105、79、275、386、So5 和 ATCC 8014)、最好属于 1b 亚群(或亚簇)(包括 256、ATCC 14917、36^E、95 和 98)。特别优选的是植物乳杆菌株 256。

也可以使用上文提到的一个或多个株的组合。

重组方面

本发明的优选实施方案是这样一种疫苗：其中所述重组植物乳杆菌包含表达载体，所述表达载体能够在胃肠道内的条件下在细胞内表达异源抗原和/或以便所述异源抗原暴露在细胞表面。

疫苗形式的重组植物乳杆菌的任何实施方案包括在本发明的范

围内，其中所述异源抗原特异性诱导针对致病微生物的免疫原性。所述宿主可以表达一种异源抗原，所述抗原对于粘膜定居病原体或通过粘膜、特别是通过口服途径进入机体的病原体具有特异性。所述异源抗原可以是胃肠道定居病原体特异性的。破伤风(破伤风梭菌，*Clostridium tetanus*)特异性异源抗原如 TTFC 是尤其合适的候选抗原。

所述重组细菌宿主(如植物乳杆菌)可以包含表达载体，所述表达载体能够在细胞内表达异源抗原和/或使所述异源抗原暴露在细胞表面上，其暴露程度足以诱导保护性免疫原性。

最好配制所述疫苗成为合适单剂剂量。然而，例如为了使胃肠道中持续存在所述细菌宿主，也设想了在一段时间内多次应用的实施方案。对于依照本发明的疫苗制剂，也设想了提供加强接种。

优选的给予方案包括在第 1 天到 4 天的任一天中给予一剂或多剂“起始”剂量，然后在第 14 天到 21 天的任一天加强给予一次或多次，任选在第 28 天到 25 天的任一天再进行一次或多次加强给予。一次起始给予、然后在这段时间内一次加强给予通常就足够了。

惊人的是，在一些病例中，已经发现：例如当使用持续 6 到 12 天的细菌宿主时，仅在第一次加强给予后就基本获得了显著的免疫应答。尽管在第一次加强时，即第 14 到 21 天，在所述个体的粪便中不能再检测到所述细菌宿主(即来自起始给予的细菌宿主)。后一个实例显示：在起始引发后 2、3 或 4 周，当再次给予所述口服疫苗时，同样引发的小鼠都得到加强。因此在一个方面，本发明涉及适于这种给予和加强方案的方法和制剂。

本发明还涉及包含重组植物乳杆菌(最好包含一种或多种表达载体)的疫苗，所述重组植物乳杆菌能够在细胞内表达所述异源抗原和/或所述异源抗原暴露在细胞表面上，其暴露程度超过就植物乳杆菌 80 表达 β-半乳糖苷酶所公开的载体的程度，或超过表达半乳糖苷酶的植物乳杆菌 80 的程度。

设想了尽可能高的表达程度，同时不损害接种的细胞或宿主的

生存力。对于免疫目的，可能需要高表达、低给予频率和低剂量。当然，剂量方案将不仅依赖于抗原的量，而且依赖于抗原类型以及所述疫苗中其它免疫原性刺激因子存在与否。

通过对所述疫苗中所述重组植物乳杆菌内存在的表达载体使用同源表达和/或分泌信号，可以获得高水平的表达。在所述实施例的构建物中存在的表达调节信号是合适有用的。其他表达信号显而易见的。根据所述表达载体所掺入的乳杆菌属菌株，它可以最优化表达。

惊人的是，发现在干酪乳杆菌中适度表达(但没有达到足以使重组干酪乳杆菌被考虑作为疫苗的程度)的表达载体为植物乳杆菌提供了足够的表达，以在口服给予时提供免疫原性。因此，本发明包括包含能在干酪乳杆菌中表达的表达载体的植物乳杆菌。预期情况并不是这样，因为首先在干酪乳杆菌内缺乏疫苗用途的足够表达，其次由于不同乳酸细菌间表达水平的不可预见性。

优选的植物乳杆菌是植物乳杆菌 256，因为该菌株提供了好的结果，该结果比在同等条件下的干酪乳杆菌更好。

抗原

所述抗原能够引发或刺激免疫应答，因此可以是任何在动物体内(最好是哺乳动物，例如人)能够引发针对其的免疫应答的任何抗原，所述免疫应答更具体地说是如上文所定义的“显著的”免疫应答和/或“保护性”免疫应答。所述抗原一般与所述疫苗所要给予的人类或动物的病原体、疾病状态和/或疾病有关系。所述抗原最好能够与一种或多种(如特异性)受体相互作用，所述受体例如存在于淋巴细胞上或存在于从淋巴细胞释放的抗体中。因此所述抗原可以是一种免疫原。由于所述抗原一般是能够引发免疫应答的抗原，因此通常排除酶(如脲酶、β-半乳糖苷酶)，例如已经在所述个体内存在的蛋白。因此抗原最好对于该个体是外源性的。

可以使用任何本身已知能够在所述微生物宿主中表达的抗原、抗原性成分或表位。通常抗原是肽、蛋白或其抗原性部分或片段，如表位。同样，它或者是天然抗原性肽或蛋白(或其部分、片段或表位)，或者是其例如通过合成或使用重组 DNA 技术获得的抗原性类似物或突变体。

可以提供重组细菌和/或细菌菌株以及以其为基础的疫苗，用于引发针对各种抗原的显著的免疫应答，最好是保护性的免疫应答。合适的抗原包括:

- 变态反应原;
- 病毒抗原和/或细菌抗原，包括 HIV 病毒抗原(如 HIV 病毒的 gp160 包膜蛋白)、表面糖蛋白(利什曼原虫属(*Leishmania*)寄生虫的表面糖蛋白)、志贺样毒素(Shiga-like toxin)、志贺氏菌属(*Shigella*)脂多糖抗原、大肠杆菌菌毛抗原、CFA 抗原(产肠毒素的大肠杆菌菌株的 CFA 抗原)、炭疽毒素、百日咳毒素、破伤风毒素;
- 来自病原体的抗原，所述病原体例如: 疱疹病毒、风疹病毒、流感病毒、腮腺炎病毒、麻疹病毒、脊髓灰质炎病毒、轮状病毒、呼吸道合胞病毒、弯曲杆菌属(*Campylobacter*)细菌、衣原体(*Chlamydial*)属生物、*Cryptosporidium* 属物种、巨细胞病毒、人类免疫缺陷病毒、放线菌属(*Actinomyces*)物种、溶组织内阿米巴(*Entamoeba histolytica*)、沙粒病毒、虫媒病毒、肉毒梭菌(*Clostridium botulinum*)、假丝酵母属(*Candida*)物种、霍乱弧菌(*Vibrio cholera*)、新型隐球酵母(*Cryptococcus neoformans*)、大肠杆菌 O157:H7、O26:H11、O111:H8 和 O104:H21 的 EHEC 株、大肠杆菌 ETEC 株、显示具有肠侵袭性的大肠杆菌菌株(EIEC)、大肠杆菌的 EPEC 株、大肠杆菌的 EAggEC 株、大肠杆菌的 DAEC 株、线状病毒科、细小病毒、丝虫目(*Filarioidea*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus*

aureus)、产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)属细菌、幽门螺杆菌、杯状病毒、兰伯氏贾第虫(*Giardia lamblia*)、淋病奈瑟氏球菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、汉坦病毒属、甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、丁型肝炎病毒、戊型肝炎病毒、军团菌属(*Legionellae*)菌株、麻风分枝杆菌(*Mycobacterium leprae*)、单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)、产气荚膜梭菌属细菌、布氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)、类鼻疽伯克霍尔德氏菌(*Pseudomonas pseudomallei*)、EB病毒、旋盘尾丝虫(*Onchocerca volvulus*)、痘病毒、百日咳杆菌(*Bordetella pertussis*)、鼠疫耶尔森氏菌(*Yersinia pestis*)、伯纳特氏柯克斯氏体(*Coxiella brunetti*)、狂犬病病毒、苍白密螺旋体(*Treponema pallidium*)、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*)、引起疟疾的真核寄生虫、肺炎卡氏肺囊虫(*Pneumocystis pneumonia*)、以及引起弓形体病的媒介。

所述变态反应原最好是人类变态反应原，或者是在所述组合物所要给予的个体类型或个体种型中引起变态反应的变态反应原。它可以是室内变态反应原或昆虫变态反应原，例如尘螨变态反应原，如Der p1。

除天然抗原和抗原性成分(包括其抗原性部分、片段或表位)外，还可以使用通过化学合成或通过重组DNA技术获得的其抗原性变体或类似物。此外，在本发明的疫苗中，可以存在或表达两种或更多种所述抗原的组合。这些抗原可以由一种(菌型或菌株)细菌宿主表达，或者由几种不同的(菌型或菌株)细菌宿主表达。

在上面提到的抗原中，在本发明的疫苗中尤其优选用作抗原的是针对和/或特异性针对以下病原体的抗原：轮状病毒、呼吸道合胞病毒、结核分枝杆菌、人类免疫缺陷病毒、大肠杆菌、霍乱弧菌、链球菌和衣原体。

所述抗原最好是这样的：在表达时，它允许所述重组细菌宿主(至少在某种程度上，而这与天然株相比可能降低)在给予后居留和/或定居在(部分)胃肠道，并保持在胃肠道。保留时间足以提供针对所述抗原和/或与其相关的病原体的显著免疫应答。

可以使用任何本身已知的表达系统在细菌宿主中表达所述抗原，所述表达系统以使得所述重组细菌宿主适于用于疫苗的方式在所述宿主中表达所述抗原。这意味着所述抗原至少应当在细胞内表达和/或使其暴露在所述细菌宿主的表面，并且所述抗原应当以合适水平表达，例如至少为总细胞蛋白的 1-5%(根据 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和标准蛋白质染色测定)。

表达系统

通常所述表达系统包含遗传构建物，所述遗传构建物包含至少一种编码所需抗原(即组成成分)的核苷酸序列，所述核苷酸序列最好操作性地连接能够在所述细菌宿主中指导所述序列表达的启动子。所要表达的抗原最好由适合所述细菌宿主的优选密码子使用的核酸序列编码。所述构建物还可以包含在所选定的细菌宿主中起作用的(所有)其它合适元件，其中包括增强子、转录起始序列、信号序列、报道基因、转录终止序列等等。

所述构建物最好采用适于转化所述细菌宿主的形式和/或能够在所述细菌宿主中稳定维持的形式，如载体或质粒。更优选使用食品级的构建物。

按照本发明尤其优选的构建物包括在 PCT/NL95/00135 (WO-A-96/32487)中描述的多拷贝表达载体，其中所述载体中已经掺入编码所述抗原的核苷酸序列。这样的构建物特别适于在乳酸细菌(尤其是在乳杆菌属)中以高表达水平表达所需蛋白或多肽，并且还可以有利地用于指导所表达的产物转运到细菌细胞表面。所述构建物(如 PCT/NL95/00135 的构建物)可以特征在于编码所述抗原的核酸序列前

面有 5′非翻译核酸序列，所述 5′非翻译核酸序列至少包含核糖体识别和 RNA 稳定所需的最小序列。该核酸序列的后面可以是翻译起始密码子，所述翻译起始密码子的后面可以(紧接着)是乳酸细菌基因的翻译核酸序列 5′末端部分的至少 5 个密码子片段，或所述片段的结构或功能等同物。所述片段也可以由启动子控制。PCT/NL95/00135 的内容、包括该文公开的不同实施方案、以及在本说明书中提到的所有其它文件都通过引用结合到本文中。

所使用的构建物最好提供这样一种表达水平：所述表达水平至少与 PCT/NL95/00135 的载体在同样细菌宿主和同等条件下所提供的水平相当(如在细胞内表达和/或暴露在表面)。

本发明的疫苗最好是口服疫苗，也就是说它们适合口服给予。这样的口服疫苗组合物通常是碱性的，因为通常需要碱中和胃酸并使所述细菌(或至少大部分细菌)通过胃到达肠时仍然存活。优选所给予的大部分细菌活着通过胃并到达肠。当所述细菌是活的(也就是说有活力)、而不是死的，就可以获得增强的免疫应答。这是因为它们可以持续在体内表达异源抗原。药用制剂并不都是碱性的，因此那些不是碱性的制剂(例如鼻制剂)不适于口服给予。

编码所述抗原的序列可以从任何天然来源获得，和/或使用众所周知的 DNA 合成技术通过合成制备。接着(例如)可以将编码所述抗原的序列掺入合适的表达载体，以提供本发明的遗传构建物，然后用所述遗传构建物转化预定的细菌宿主菌株(如在 PCT/NL95/00135 中所述)。

然后可以培养如此获得的重组细菌宿主，可选地在进一步的纯化和/或加工步骤(如冻干形成粉末)后，所收获的细胞可以用于配制疫苗。

需要用于产生包含所述抗原编码序列的遗传构建物以及用于转化、培养和收获所述细菌宿主的技术是本领域内众所周知的。例如在 PCT/NL95/00135 和标准手册中有关于它们的描述，包括 Sambrook

等, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual"(第二版), 第 1-3 卷, Cold Spring Harbor Laboratory (1989)和 F. Ausubel 等编著, "Current protocols in molecular biology", Green Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)。

可以以已知方法配制包含所述细菌宿主的疫苗，所述方法例如用于动物或人口服给予的疫苗配制方法和/或活细菌制剂配制方法。可以参考关于口服给予的益生菌(如为了治疗胃肠疾病)的制备方法。

依照本发明的疫苗可以采用适于口服给予的形式，所述形式可以是固体形式、半固体形式或液体形式，包括但不限于通常优选的所述细菌的溶液和/或悬浮液。

所述疫苗制剂也可以采用粉末的形式，如可以在使用前重建(如用合适液体)的冻干粉末。它可以采用在给予前与固体、半固体或液体食物混合的固体或液体制剂形式。它也可以采用发酵产品的形式。

除所述细菌外，所述疫苗可以包含一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂，如水。所述疫苗也可以包含一种或多种适于口服给予的佐剂，如免疫佐剂。这些物质与所述细菌宿主匹配，并最好不(太严重地)干扰其所需的免疫原性特性。依照一个实施方案，所述佐剂可以是乳酸细菌，如所述细菌宿主本身、一种上文提到的其它植物乳杆菌菌株、另一种乳杆菌属细菌、甚至是适于口服给予人类或动物的乳球菌属(*Lactococcus*)、双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)或丙酸杆菌属(*Propionibacterium*)细菌。

此外，所述疫苗可以包含一种或多种其它药用物质和/或一种或多种可促进和/或增强所述细菌在(部分)胃肠道定居和/或所述细菌在胃肠道中的生长的物质。所述制剂还可以采用适于例如通过管或导管(直接)给予胃或肠的形式。所述细菌宿主在口服给予时最好居留在、并因此可以定居在胃肠道或至少其部分，如口腔、肠、小肠(如十二指肠、空肠或回肠)、大肠(或其部分，如盲肠)或结肠，最好是在小肠或盲肠。

免疫原性

因此，由所述细菌宿主表达的抗原可以与粘膜层、胃肠道的内层和/或壁(本文总称为“胃肠道壁”)接触，更具体地说是与该壁内的细胞相接触。这可以介导针对如此呈递的(例如抗原呈递细胞(例如巨噬细胞、树突细胞和/或 B-淋巴细胞))抗原的免疫应答。这种胃肠道壁内细胞的免疫应答本身已经可以构成如本文所定义的显著免疫应答，和/或它可以进一步触发所述疫苗所给予的人类或动物体内的免疫反应/应答，这也可以是如本文所定义的显著反应和/或保护性反应。然而，本发明不限于通过重组细菌宿主引发任何免疫应答的任何特定机制。例如，与由同样抗原(如(游离的)可溶蛋白)引发的应答相比，由所述细菌宿主表达的抗原所引发的免疫应答可以提供更强烈或增强的免疫应答。

在本发明中，与给予、表达和/或使用作为游离可溶性蛋白的所述抗原相比，所述抗原呈递和/或传递到胃肠道壁和/或其中的特定细胞(例如介导和/或参与免疫应答的细胞)的方式得到改善或增强。例如，由于所述细菌宿主可以附着到胃肠道的壁上并可以原位持续相当长的时间，因此所述抗原在胃肠道壁局部的呈递量更大、水平或浓度更高、更稳定或更有抗性和/或呈递时间更长。因此这些因素中的任何一种都可以提供(增强的)免疫应答。

所述细菌宿主或其任何部分或片段和/或其产生的任何其它化合物可以与胃肠道壁和/或其中的特定细胞相互作用，所述细胞如介导和/或涉及免疫应答的细胞。例如与给予、表达和/或使用作为游离、可溶蛋白的抗原相比，这可以引起、促进或增强针对与所述细菌宿主结合的抗原的免疫反应。

虽然所述抗原最好由所述细菌宿主表达以便所述抗原暴露于细胞表面，但并不排除为了增强免疫应答，由所述细菌宿主在原位(即在胃肠道壁局部)释放和/或放出所述细菌宿主的细胞内容物，如通过

使所述细菌细胞壁的壁可通透和/或破坏所述细胞或细菌细胞壁的机制。因此，有可能完整的细菌宿主不会引起/引发(在胃肠道壁原位的)免疫原性应答，而是由其部分、片段、小部分或化合物例如所述抗原本身和/或包含所述抗原的细胞片段或细胞部分引起/引发免疫原性应答。因此，虽然优选所述疫苗包含完整、有活力和/或活的细菌，但并不排除(例如，同时)包含来自所述重组细菌宿主的片段、部分、溶菌产物等等的疫苗。

剂量

所给予细菌的量并不是关键的，但给予剂量最好足以使所述细菌居留和/或定居在(需要部分)胃肠道，和/或引起显著的免疫应答。合适的剂量是每剂至少 10^8 cfu，最好 10^8-10^{10} cfu。这将允许足够量的细菌进入肠道，如果需要的话。低于 10^8 cfu 剂量的口服给予并不总能获得所需的免疫原性(至少不以可靠的方式)，而大于 5×10^{10} cfu 的量在不利于口服给予时不是优选的。例如，上面所述细菌量(剂量)可能相当于每公斤体重(人类或动物)10^6 到 10^8 cfu。在所述疫苗(或其它制剂)中细菌的浓度可以是至少 5×10^9/ml，如至少 10^{10}/ml。可以仅给予所述制剂长至 2、3 或 4 天。在第一次或最后一次给予后至少 5 天、7 天或 9 天，在所述个体中仍然可以检测到所述细菌。

疫苗

需要接种的个体最好是人类或动物。所述人类可以是婴儿、无免疫应答的人、老人或正常的健康婴儿、儿童或成人。

所使用的细菌宿主的一个好处是它们能够存活/通过肠道而足量定居在肠道内。然而，人们可以给予所述细菌的包衣制剂或胶囊化制剂，例如延迟释放组合物或肠溶包衣组合物形式。合适的胶囊化化合物包括但不限于壳聚糖、麦芽糊精、脂质和寡糖及多糖。胶囊化也可以改善所述疫苗的保存期。所述疫苗可以不含佐剂，但最好

包含一种或多种佐剂。

虽然本发明主要参照植物乳杆菌菌株进行了描述，但是也可能存在证明适合用作例如本发明疫苗中的细菌宿主的其它各种乳杆菌属细菌的菌株。这样的菌株可以包括来自以下细菌的菌株：戊糖乳杆菌、路氏乳杆菌(*L. reuteri*)、动物乳杆菌(*L. animalis*) (=鼠乳杆菌(*L. murinus*))、发酵乳杆菌、嗜酸乳杆菌(*L. acidophilus*)、卷曲乳杆菌(*L. crispatus*)、加氏乳杆菌(*L. gasseri*)、约氏乳杆菌(*L. johnsonii*)、唾液乳杆菌(*L. salivarius*)、短乳杆菌、鼠李糖乳杆菌和/或类干酪乳杆菌(*L. paracasei*)。

用于本发明的菌株最好具有 GRAS 状态，更优选是食品级。此外，它们最好与上文提到的 PCT/NL95/00135 的表达载体、或另一种与这种优选表达载体产生相似表达水平(如在细胞内表达和/或暴露在所述细菌宿主的表面的表达)的载体组合使用。

此外，虽然优选使用属于乳杆菌属的菌株，但设想也有可能从双歧杆菌和丙酸杆菌如从双歧杆菌属和/或丙酸杆菌属选出合适的菌株。技术人员可以采用与选出植物乳杆菌和/或乳杆菌相同的方式，选出合适的菌株。

例如，用于确定/确认选定菌株是否适于用作按照本发明细菌宿主的合适测定如下：用携带 TTFC 的载体 pLP401(用于 TTFC 抗原的表面锚定/表面暴露表达)和/或携带 TTFC 的载体 pLP503(用于 TTFC 抗原的细胞内表达)转化所述宿主，然后最好按照实施例中提到的单剂激发和加强方案，将如此获得的重组宿主口服给予动物、最好是哺乳动物(如小鼠，例如 BALB/c 和/或 C57bl/6 小鼠)，在此之后使用破伤风类毒素通过 ELISA 测量个体血清中 IgG 的终点滴度。在这样的测定中，当使用同样载体转化并在同样条件下给予时，所选定的重组宿主最好提供比植物乳杆菌 NICMB8826 和/或植物乳杆菌 80 更高(即至少高 1%)的抗体滴度；更优选抗体滴度至少高 10%，甚至更优选至少高 20%。

所选定的重组宿主最好提供这样的滴度：该滴度是用同样载体转化并在同样条件下给予的植物乳杆菌 256 提供的滴度的至少 70%、更优选至少 90%，甚至更优选所述滴度至少相当于用同样载体转化并在同样条件下给予的植物乳杆菌 256 所提供的滴度。

本发明还涉及前面描述用于本发明疫苗的细菌。本发明还涉及适于异源抗原在细胞内表达或暴露在细胞表面的表达载体。这种表达将发生在细菌内；例如如前所述的植物乳杆菌。

本发明还涉及使用经修饰表达异源抗原(如在细胞内和/或在细胞表面)的乳杆菌(如植物乳杆菌)生产疫苗，所述疫苗用于所述未修饰的植物乳杆菌对其是外源性的个体。所述未修饰的植物乳杆菌最好不存在于人类(或人类食物)，或例如不存在于哺乳动物的胃肠道或粘膜。本文所述的细菌可以用于生产疫苗。所述疫苗可适用于口服给予。所述细菌最好在给予时引发免疫应答。本发明的疫苗尤其可以用于破伤风或预防破伤风。

假如法律允许，本发明也涉及将所述细菌或疫苗给予个体，如人类或动物(如哺乳动物)，所述个体(或合适对象)需要细菌或疫苗。如上文所述，所述个体可能需要治疗或预防特定疾病。

本发明一个方面的优选特征和特点同样适用于另一方面的必要修改。

现在将通过下面涉及附图的实施例举例说明本发明，提供所述实施例的目的仅仅是为了举例说明，不应当认为本发明仅限于随后的实施例。

实施例

概述

通过安全非侵袭性载体如共生乳杆菌，传递抗原到儿科和无免疫应答人群的粘膜相关性淋巴组织中，这代表了对流行的接种选择的至关重要的改进。使用为在乳杆菌属中表达异源基因而构建的疫

苗，描述了对小鼠的口服和经鼻免疫，其中破伤风毒素的 50kDa 片段 C 表达为细胞内蛋白或者表面暴露蛋白。数据显示植物乳杆菌比干酪乳杆菌更有效。在口服或经鼻传递疫苗菌株后，活重组乳杆菌免疫小鼠诱导显著水平的循环的 TTFC 特异性 IgG。此外，在经鼻给予后，诱导了支气管肺泡灌洗液中的 sIgA、引流淋巴结中的抗原特异性抗体分泌细胞和抗原特异性 T 细胞激活，证实了它们可安全用于粘膜传递儿科疫苗。

在粘膜免疫的目标位点有活力的活微生物疫苗载体代表了同时在粘膜位点和系统位点促进免疫应答的有效传递系统。目前为止的观察已经强调了减毒致病病毒和细菌与非复制型抗原相比在诱导粘膜免疫应答上的优越性。因此，基于肽或纯化的重组蛋白的口服亚单位疫苗方法可能在这一重要的必要条件(即在胃肠道本身诱导保护性免疫)上是不完善的。口服接种仍然是安全及便宜的，同时保持进行单剂免疫的潜力，因此这有利于改善接种方案的顺从率。目前，针对破伤风的接种涉及破伤风类毒素(TT)制剂，这种接种覆盖差并且有与所有同时注射针传递疫苗的污染风险。破伤风毒素片段 C (TTFC)是破伤风全毒素的 50kDa 无毒性木瓜蛋白酶切割产物，是可替代使用的保护性免疫原，目前用于几种开发中的活载体系统。出于对肠胃外疫苗所面临的障碍的理性反应，人们通过合适的活微生物载体将疫苗亚单位传递到粘膜表面。然而，潜在的安全性和环境考虑，尤其是发展中国家疫苗接受者的免疫状况，仍然否定了使用大部分粘膜传递载体候选者如大肠杆菌、沙门氏菌属和痘苗病毒。因此，非致病性、食品级或共生细菌载体已经由于它们用作疫苗的潜力而受到注意。

共生细菌与宿主保持复杂非侵袭性生态学，它们虽然受到免疫系统监视，但不一定对它们的生态学小生境中的免疫清除敏感。乳杆菌在气性消化道各个部位内优势存说明了它们用作口服活疫苗的独特潜力。根据它们在食品工业中的应用，它们的“一般认为是安

全的”(GRAS)状态看来是显而易见的；在共同给予 DxRRV 猕猴-人重分配口服轮状病毒疫苗和 TNP-缀合抗原时，已经证实了它们增强免疫应答的能力，其效果可能是由于格兰氏阳性肽聚糖和脂磷壁质酸组份的巨噬细胞激活特性和 IFN-γ诱导特性。乳杆菌所参与的粘膜免疫稳态综合存在物理性排阻、IgA 分泌和 T 细胞亚型主动调节。如下研究了口服传递后避免抗原特异性外周耐受性(口服耐受性)的可能性：以颗粒形式(与可溶膳食性抗原不同)的 TTFC 进行接种，以允许通过一般性肠道菌群的免疫调节机制进行加工和呈递。数据显示：与干酪乳杆菌 393 相比，植物乳杆菌 256 株更有效，并且作为细胞内抗原表达的 TTFC 的传递在某些情况下比细胞表面表达稍好(在测试条件和所使用的检测技术下)。

重组 DNA 技术

使用大肠杆菌 DH5α作为宿主株以操作以前所述的 pLP401 或-503 穿梭载体(Maassen 等, Vaccine 17: 2117, 1999)。使用 PCR 技术在 3′端延长编码 TTFC 的 1329 bp DNA (A. Mercenier, Lille, France)，使其具有 *Xho* I 和 *Nco* I 限制位点，以促进克隆入 pLP401 和 pLP503 穿梭载体。

在通过电穿孔将所述质粒转移进入乳杆菌前，通过 *Not* I 消化除去在所述穿梭载体上存在的 T*ldh* 终止子序列，得到在下面表 1 中所示的 pL401 和 pLP503 质粒。

表 1: 使用的细菌菌株和质粒

菌株或质粒	相关基因型或表型	来源/参考文献
植物乳杆菌	256，野生型	本研究
干酪乳杆菌	393	ATCC
pLP503-TTFC	P-*ldh*, Amp^r, Ery^r, TTFC	Pouwel 等, 1996, 见上文
pLP401-TTFC	P α -*amy*, Amp^r, Ery^r, ssAmy, Anchor, TTFC	Pouwel 等, 1996, 见上文

其中：p-*ldh* = 干酪乳杆菌的 *ldh* 基因的启动子序列，P α -*amy* = 食淀粉乳杆菌(L. amylovorus)的 α -淀粉酶基因的启动子序列，Ery^r = 红霉素抗性基因，Amp^r = 氨苄青霉素抗性基因，ssAmy = 编码干酪乳杆菌的 α -淀粉酶基因分泌信号(36 个氨基酸)的序列，Anchor = 干酪乳杆菌的锚定肽(117 个氨基酸)编码序列，TTFC = 编码破伤封毒素片段 C 的 1329 bp DNA。

所述载体的重连接将所述 TTFC 蛋白编码序列符合读框地与下列序列并列连接起来：分别存在于 pLP401 和 pLP503 中的调节型淀粉酶基因(α -淀粉酶)下游的翻译起始区密码子或组成型乳酸脱氢酶(*Ldh*)基因启动子序列。在电穿孔感受态乳杆菌后，在红霉素(5 μ g/ml)琼脂平板上选择转化体。使用已知技术(Maassen 等，见上文)进行通用分子克隆技术和乳杆菌的转化。

乳杆菌属菌株的选择

如下鉴定适于用作转化宿主菌株的乳杆菌：在用一系列利福平抗性野生型乳酸杆菌以 10^9 细胞单剂胃内接种小鼠后，定量培养获得的排泄物样品。选择在胃肠道内持续达 12 天的植物乳杆菌 256 (P. Conway, Sydney, Australia 或 Adlerberth 等, Appl & Env. Microbiology, 第 62 卷(7): 2244-2251, 1996)以及在 72 小时内就检测不到的干酪乳杆菌 (ATCC 393)作为原型宿主菌株。

凝胶电泳和蛋白质印迹分析

从甘油贮藏物中按照常规制备包含表 1 中详细描述的质粒的重

组干酪乳杆菌和植物乳杆菌：在含 5μg/ml 红霉素的 MRS 培养基中半无氧过夜(o/n)培养 1:50 的稀释物。

最好在含 2%(w/v)葡萄糖的抗生素选择性 LCM 培养基中，于 37℃下，培养携带有包含组成型 *ldh* 启动子的质粒的转化体。通过在含有甘露醇(2% w/v)的 LCM 培养基中以 1:50 稀释细胞的过夜培养物，培养携带有包含调节型 α-淀粉酶启动子的质粒的转化体。使用 W870 Branson™超声波仪，以开 30 秒钟/关 30 秒钟的循环超声波破碎细胞四次，释放胞质蛋白或细胞膜结合蛋白，从而从所述细菌获得总细胞提取物。

通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)，(10%丙烯酰胺，400 mM Tris [pH 8.9])在 25 mM Tris，192 mM 甘氨酸缓冲液(pH 8.3)中以 200V 进行 45 分钟，分离在 30μg 总细胞提取物中的蛋白。使用 Biorad™ 电泳装置将蛋白质电泳转移到硝酸纤维素上。使用最佳稀释的兔 TTFC 特异性抗血清和山羊抗兔 IgG 特异性磷酸酶缀合物(Nordic, Tilburg, 荷兰)显影免疫印迹。

细胞表面表达 TTFC 的流式细胞术分析

在确定时间点，制备细菌以通过 FACScan 进行分析。细胞洗涤两次，并重悬浮于 PBS/1%牛血清白蛋白(BSA)中。在所述细胞中加入 50μl 最佳稀释的兔 TTFC 特异性抗血清处理 1 小时。再次洗涤细胞两次，并通过与以 1:1000 稀释的异硫氰酸荧光素缀合(FITC)抗兔温育 30 分钟，检测结合的抗体。洗涤细胞两次后，用 Becton-Dickinson 流式细胞仪分析光散射和荧光。根据前向散射和侧向散射的细胞质量(cytogram)，在大致合适尺寸事件设置一个门(gate)。通过染色野生型干酪乳杆菌 393 或植物乳杆菌 256、用未免疫兔血清染色重组体或排除兔 TTFC 特异性抗血清，从而制备对照。所有程序都在冰上用 1%BSA 进行。对每个样品收集 10,000-20,000 个闸门事件的数据。从细菌细胞悬浮液中获得的荧光用荧光柱状图代表，并计算平均通道

强度。

免疫

用表达 TTFC 的重组干酪乳杆菌或植物乳杆菌制剂胃内(o)或鼻内(i.n.)免疫 6-8 周龄 BALB/c 或 C57BL/6 小鼠。从过夜培养物中获得的细菌在 MRS 或含 1%葡萄糖的 LCM 培养基中 1:50 稀释，在 37℃培养 6 小时直到 OD695nm 达到 0.6-0.8(对数期中期)。通过在 4℃离心而沉淀细胞，用 PBS 洗涤细胞一次，并在无菌 PBS 中制备合适浓度的细菌。

为进行口服免疫，连续三天胃内给予在 250 μl 体积 0.2 M $NaHCO_3$ 中的 2-5 x 10^9 细胞。为进行鼻内免疫，将在 20 μl 体积 PBS 中的 2-5 x 10^9 细胞给到未麻醉小鼠鼻孔。对照小鼠接受相同剂量的野生型乳杆菌。对所有接种物样品进行平板计数，以确认给予小鼠的 CFU 量。

样品收集和 ELISA

从免疫前小鼠尾静脉获得的血液样品制备血清，并从免疫后 21 开始以 7 天间隔从小鼠尾静脉获得的血液样品制备血清。

为获得支气管肺泡灌洗液样品，在特定时间点处死小鼠，插导管进入肺内，并用 0.7 mlPBS/0.1%BSA 反复灌洗，然后在 1000 g 下离心收集到的洗液，并将上清液贮藏在-80℃。

使用以 50 μl 0.16 μg/ml 的 TT 溶液(RIVM, Bilthoven, 荷兰)过夜包被的微量滴定板，评估抗原特异性免疫球蛋白 G (IgG)水平。通过连续的 log_2 稀释物滴定各个血清样品，并进行一式二份测定。通过加入 50 μl 最佳稀释的山羊抗小鼠 IgG 磷酸酶缀合物(Nordic, Tilburg, 荷兰)，检测结合的抗体。在加入 PNPP(在 0.1 M DEA/$MgCl_2$ 中，1 mg/ml)色原底物后，通过测量反应起始 30-90 分钟后获得的平板 A405nm 值，定量抗体水平。使用由免疫前小鼠获得的 1:10 稀。释血清的平均吸

光度(OD 0.2)确定的临界点，计算终点滴度。对于支气管肺泡灌洗液中的抗原特异性免疫球蛋白 A (IgA)水平，则使用最佳稀释的山羊抗小鼠 IgA 磷酸酶缀合物(Nordic)，进行同样程序。

抗原特异性 T 淋巴细胞增殖测定和 ELISPOT

在最后一次免疫后的第 12 天和第 21 天，无菌操作取出小鼠的脾和颈淋巴结(CLN)。使其通过一个细胞滤网(70uM Nylon; B & D,)并在 1500 rpm 离心 10 分钟，制备单细胞悬浮液。通过锥虫蓝染料排阻来评估有活力并且未分级分离的细胞数目。

为了测试抗原特异性 T-淋巴细胞增殖，将细胞重悬浮并以 3×10^5 细胞/脾或 5×10^5 细胞/LN 的浓度接种到无菌平底 96 孔培养板(Nunc, 丹麦)中，终体积为 200 μl 的培养基(RPMI-1640，补充 10%热失活的胎牛血清、2 mM L-谷氨酰胺、20 U/ml 青霉素和 20 μg/ml 链霉素(都来自 Gibco, Pairsley, UK)和 50 μM 2-巯基乙醇{Sigma, MO})。对照孔仅含培养基，而抗原则按指定剂量范围加入三个平行培养物中。所有细胞在湿化 5% CO_2 空气中在 37℃下维持 4 天。在收获前最后的 16-18 小时内，用 0.6uCi[^{3}H] 胸苷(^{3}H-TdR, 5 Ci/mMol, TRA 120, Amersham, UK)以 30 μl体积/培养孔脉冲标记所述细胞。使用 ILACON 细胞收集器收集细胞，并将细胞放置到玻璃纤维滤膜片(Whatman)上。通过气体闪烁光谱测定法(β-平板计数器，Canberra Packard, Meriden, CT)评估胸苷掺入，结果按照三个平行培养物的平均 c.p.m(±SD)计算，并表示为刺激指数(SI)。

按照 Czerkinsky 等, J. Immunol. Methods 65: 109 (1983)，定量所述脾和 CLN 中 TT 特异性抗体分泌细胞(ASC)的数量。微量滴定板(Maxisorp plates, Nunc, 丹麦)用 50 μl 0.16 μg/ml 的 TT 溶液(RIVM, Bilthoven, 荷兰)或作为对照的 50 μl PBS 包被过夜。彻底洗涤、并用 PBS/0.1%BSA 封闭板后，将细胞以 1×10^6 及 2×10^5 细胞/脾或 5×10^5 及 1×10^5 细胞/LN 的浓度加入 50 μl 终体积的培养基中，在湿化 5%

CO_2 空气中在 37℃下温育 4 小时。洗板并用含 10 mM EDTA 的冰冷的 PBS 温育 20 分钟以除去细胞，然后用 PBS/0.05% Tween-20 和 PBS/0.5% BSA 再次洗涤。通过加入 50 μl 最佳稀释的兔抗小鼠 Ig 磷酸酶缀合物(DAKO, 丹麦)于 4℃过夜，检测结合的抗体。充分洗板，并与含 1%低融温度琼脂糖的 AMP 缓冲液中的 1 mg/ml BCIP 温育。将所述平板翻转放在光源上，显微镜计数观察到的蓝点。

重组 TTFC 在乳杆菌中的表达

收集对数期中期细胞，超声处理破碎所述细菌，证明植物乳杆菌和干酪乳杆菌转化体胞质表达 TTFC 或表达细胞壁结合 TTFC。通过 SDS-PAGE 分离蛋白，并使用 TTFC 特异性兔抗血清显示免疫印迹。

具体地说，在 LCM(+2%甘露醇)中培养 pLP401-TTFC 转化体(表面锚定表达)，在 MRS (Difco)中培养 pLP503-TTFC 转化体(细胞内表达)，(两种培养基都补充了 5 μg/ml 红霉素)，在 37℃下培养到 OD 0.6，然后沉淀并通过超声处理进行破碎。在 10%SDS/聚丙烯酰胺凝胶上电泳分析 30 μg 总蛋白，并将分离的蛋白通过电泳转移到硝酸纤维素膜上。用兔抗 TTFC (1:500)和磷酸酶/PNPP 色原组合使 TTFC 显色。条线指示分子量标记的迁移。

对表达 TTFC 为表面锚定产物的重组植物乳杆菌 pLP401-TTFC 和干酪乳杆菌 pLP401-TTFC 进行免疫荧光分析。根据前向和侧向散射门控乳杆菌，并用按1:500稀释的兔TTFC特异性抗血清(Calbiochem, Ca)染色。用最佳稀释的 FITC 缀合抗兔 IgG (Jackson, PA)检测结合抗体。通过 FACScan (Becton Dickinson)分析在 OD 0.6 收集的细胞的荧光水平，并将所述荧光水平以柱状图显示，显示数据相对于与用非重组乳杆菌获得的荧光水平。在每个实验中分析 10,000 个细胞。

从蛋白表达的照片和 Mackintosh 产生的 FACScan，显示包含 pLP503-TTFC 的乳杆菌仅表达细胞内 50kDa TTFC 多肽。包含载体

pLP401-TTFC 的植物乳杆菌表达表面锚定的 75kDa 多肽，该多肽相当于与 25kDa 锚定序列融合的 50kDa TTFC，其水平高于干酪乳杆菌 pLP401-TTFC 的水平。通过 FACScan，确认了 TTFC 通过与锚定序列融合而暴露在植物乳杆菌和干酪乳杆菌的细胞壁上。

在用重组乳杆菌鼻内免疫后的 TTFC 特异性抗体应答

从免疫前小鼠收集血清，并从第 7 天开始以 7 天间隔从小鼠收集血清。使用以 PBS 中 0.16μg/ml 破伤风类毒素在 4℃下包被过夜的微量滴定板，通过 ELISA 测量个体或汇集的血清中的 TTFC 特异性血清 IgG。通过加入抗小鼠 AP 缀合物和 PNPP 底物，检测结合的抗体。90 分钟时测量每个孔的 OD_{405nm} 值。使用按照 1:10 稀释的免疫前血清的平均 OD+2 SD's (≈0.2)计算的临界点，确定终点滴度。表 2 显示了下面三种方法的结果。

A. 在第 1-3 天用 3 剂 20μl PBS 中的 5 x 10^9 植物乳杆菌 pLP503-TTFC 或 3 剂 20μl PBS 中的 5x10^9 干酪乳杆菌 pLP503-TTFC 鼻内免疫 3 只 BALB/c 小鼠。在第 28-30 天给予相同的加强免疫。

B. 在第 1-3 天用 3 剂 20μl PBS 中的 5 x 10^9 植物乳杆菌 pLP503-TTFC 鼻内免疫、或用 3 剂 200μl $NaHCO_3$ 中的 5 x 10^9 植物乳杆菌 pLP503-TTFC 口服免疫 16 只 C57BL/6 小鼠。在第 28-30 天给予相同的加强免疫。

C. 在第 1 天和第 28 天用 20μl PBS 中的 5 x 10^9 植物乳杆菌 pLP503-TTFC 鼻内免疫 3 只 BALB/6 小鼠；或在第 1-3 天用 3 剂 20μl PBS 中的植物乳杆菌 pLP401-TTFC 鼻内免疫 3 只 BALB/6 小鼠，然后或者在第 28-30 天用 20μl PBS 中的 5 x 10^9 植物乳杆菌 pLP503-TTFC 进行一次鼻内加强，或者在第 28-30 天和第 49-51 天用 20μl PBS 中的 5 x 10^9 植物乳杆菌 pLP401-TTFC 鼻内进行加强。

在第 1-3 天接受三次鼻内剂量的细胞内表达 TTFC 的植物乳杆菌或干酪乳杆菌的 BALB/c 和 C57BL/6 小鼠受到强烈的引发，在第 28-30 天接受鼻内加强给予后发生对 TTFC 的继发反应。在用重组植物乳杆菌免疫后的 BALB/c 小鼠中 TTFC 特异性应答的滴度高于使用重组干酪乳杆菌的滴度(表 2A)，早至第 28 天就可以检测到 IgG，滴度在第 49 天分别上升到 $10^{3.5}$ 和 $10^{2.9}$。

表 2A：滴度(log_{10})与免疫后天数的关系

	天数	0	23	35	42	49
鼻内免疫植物乳杆菌 TTFc	平均值*	0.0	0.0	1.2	3.5	3.4
	标准差	0.0	0.0	0.43	0.63	0.75
鼻内免疫干酪乳杆菌 TTFc	平均值	0.0	0.0	0.3	2.95	2.8
	标准差	0.0	0.0	0.60	0.78	0.50

*终点滴度(TT 特异性 IgG)

C57BL/6 小鼠显示出比 BALB/c 小鼠更高的平均终点滴度(虽然并不显著)(表 2B)，因此选择 C57BL/6 小鼠进行进一步分析，就是使用在细胞内表达 TTFC 的植物乳杆菌转化体，用单剂引发和加强方案进行鼻内免疫(表 2C)。

表 2B：滴度(log_{10})与免疫后天数的关系

	天数	0	23	35	42	50
口服免疫植物乳杆菌 TTFc	平均值*	0.000	0.100	0.881	1.350	0.986
	标准差	0.000	0.400	1.234	1.319	1.258
鼻内免疫植物乳杆菌 TTFc	平均值*	0.000	1.840	4.275	4.219	4.163
	标准差	0.000	1.172	0.338	0.417	0.407

*终点滴度(TT 特异性 IgG)

表 2C：滴度(log_{10})与免疫后天数的关系

植物乳杆菌 pLP401-TTFC/用植物乳杆菌 pLP401-TTFC 加强

天数	0	14	28	42	49	56	63	70	77	88
平均值*	0	0	0.2	0.1	0.05	1.55	1.9	2.2	2.7	2.8

植物乳杆菌 pLP401-TTFC/用植物乳杆菌 pLP503-TTFC 加强

天数	0	14	28	42	49	56
平均值*	0	0	0	2.7	3.4	3.95

植物乳杆菌 pLP503-TTFC/用植物乳杆菌 pLP503-TTFC 加强

天数	0	14	28	42	49
平均值*	0	0	1.2	4.0	4.1

*终点滴度(TT 特异性 IgG)

与表2A在BALB/c小鼠中获得的结果相比，到第49天在C57BL/6中诱导了更高的血清 IgG 平均滴度($10^{4.2}$)。然而，不考虑是使用三剂量还是单剂量引发和加强免疫方案，C57BL/6 小鼠显示出没有显著不同的血清 IgG 终点滴度增加。

与此不同，为了在使用在细胞表面表达 TTFC 的植物乳杆菌鼻内免疫的 C57BL/6 小鼠体内诱导 TTFC 特异性血清 IgG，需要在第 1-3 天对小鼠进行引发，并随后至少加强两次(在第 28-30 天和第 49-51 天)，然后才能测量到抗原特异性应答(表 2C)。然而，有趣的是，如上文用植物乳杆菌 pLP401-TTFC 引发的小鼠，在第 28-30 天用植物乳杆菌 pLP503-TTFC 转化体加强时，的确诱导了 TTFC 特异性血清 IgG(动力学比首次用于实验的小鼠的应答更迅速)(表 2C)。这项观察令人感兴趣地提示：小鼠的抗原特异性致敏实际上发生在给予用 pLP401-TTFC 转化的植物乳杆菌之后，虽然所述免疫应答的成熟和可测量性由于各种原因而没有发生。然而，与此不同，在细胞表面表达 TTFC 的干酪乳杆菌不能在 BALB/c 品系或 C57BL/6 品系中显示任何引发效应，而在第 1 天、第 28 天和第 56 天单剂量给予植物

乳杆菌转化体本身也如此。

在用植物乳杆菌 pLP503-TTFC 鼻内免疫小鼠后，研究在支气管肺泡灌洗液中的破伤风类毒素特异性 IgA 抗体的诱导情况。C57BL/6 小鼠在第 1-3 天用 5 x 10^9 植物乳杆菌 pLP503-TTFC 鼻内(A & B)或口服(C & D)免疫，然后在第 28-30 天鼻内(A & B)或口服(C & D)进行相同加强免疫。在 12 (A & C)和 21 (B & D)天，在最后一次加强后，每组处死 4 只小鼠，通过用导管以 0.7 ml PBS/0.1%BSA 冲洗肺，获得支气管肺泡灌洗液。使用以 PBS 中 0.16 μg/ml 破伤风类毒素在 4℃下包被过夜的微量滴定板，通过 ELISA 测量这些样品中的 TT 特异性 IgA。通过加入抗小鼠 AP 缀合物和 PNPP 底物，检测结合的抗体。在 4℃下过夜后测量每个孔的 OD_{405nm} 值。

如表 3A & 3B 所示，在第 1-3 天接受三剂表达 TTFC 的植物乳杆菌的 C57BL/6 小鼠进行粘膜引发，在第 28-30 天鼻内给予加强后的第 12 天和第 21 天，在支气管肺泡灌洗液中测量到 TT 特异性 IgA 应答。在第 12 天及第 21 天，从用野生型植物乳杆菌 256 鼻内免疫的小鼠获得的支气管肺泡灌洗液都没有显示与 TT 包被的微量滴定板的反应性。

表 3A、B、C 和 D: OD_{405nm} 与鼻内(A, B)或口服(C, D)加强后天数的关系

12 天(A) 鼻内免疫植物乳杆菌	*1	2	3
小鼠 1	**0.503	0.42	0.353
小鼠 2	0.545	0.501	0.439
小鼠 3	0.356	0.297	0.263
小鼠 4	0.246	0.193	0.174

21 天(B) 鼻内免疫植物乳杆菌	1	2	3
小鼠 1	0.435	0.368	0.306
小鼠 2	0.34	0.268	0.256
小鼠 3	1.059	0.78	0.645
小鼠 4	0.648	0.508	0.43

12 天(C) 口服免疫植物乳杆菌	*1	2	3
小鼠 1	0.233	0.22	0.21
小鼠 2	0.211	0.198	0.206
小鼠 3	0.219	0.209	0.191
小鼠 4	0.205	0.188	0.179

21 天(D) 口服免疫植物乳杆菌	1	2	3
小鼠 1	0.167	0.177	0.138
小鼠 2	0.196	0.167	0.169
小鼠 3	0.187	0.181	0.165
小鼠 4	0.2	0.164	0.145

*稀释倍数

** OD_{405nm}(TT 特异性 IgA ELISA)

在用重组乳杆菌口服免疫后的 TTFC 特异性抗体应答

在一项鼻内免疫与口服免疫的比较研究中，C57BL/6 小鼠在第 1-3 天接受三剂细胞内表达 TTFC 的植物乳杆菌，然后在第 28-30 天接受加强给予。在口服免疫后，测试的 16 只小鼠中有 9 只发生了 TTFC 特异性血清 IgG 应答的诱导(表 2B)。在鼻内免疫后，所有 16 只小鼠都应答产生高 TTFC 特异性终点滴度，在加强后 7 天内平均滴度为 $10^{4.3}$，该滴度保持高水平长达 3 周。口服应答在第 7 天的平均终点滴度是 $10^{1.6}$，并在加强后第 14 天达到峰值 $10^{2.4}$。与鼻内组不同，在口服免疫的小鼠中，在第 12 天和第 21 天都没有在支气管肺泡灌洗液中测量到 TT 特异性 IgA 应答(表 3 C & D)。

在另一项研究中，小鼠在第 1、2 和 3 天接受口服引发，并在 2、

3 或 4 周后接受加强。不论加强的时间的时间如何，在加强接种后 7 天内均观察到 TTFC 特异性 IgG 应答。

与此不同，用干酪乳杆菌转化体(在细胞内表达 TTFC 或表面锚定 TTFC)或在细胞表面表达 TTFC 的植物乳杆菌口服免疫的 BALB/c 或 C57BL/6 小鼠在所有等同的检查时间点都不能诱导可检测的 TTFC 特异性血清 IgG 应答。接受野生型乳杆菌或不相关载体的小鼠在任何时间点都没有显示出 TTFC 特异性血清 IgG 应答(数据未显示)。

脾和 CLN 中的 TT 特异性抗体分泌细胞和 T 细胞应答

在第 1-3 天，使用 5 x 10^9 植物乳杆菌 pLP503-TTFC 转化体或作为对照的野生型植物乳杆菌 256，口服或鼻内免疫 C57BL/6 小鼠。随后在第 28-30 天同样加强免疫。在最后一次加强后的第 12 天或第 21 天，处死小鼠，并制备脾细胞和 CLN 细胞悬浮液。

表 4：在最后一次加强后 12 天和 21 天，在脾和颈淋巴结中每 10^6 细胞中破伤风类毒素特异性抗体分泌细胞的枚举。

	12 天		21 天	
组别*	脾	CLN	脾	CLN
口服免疫植物乳杆菌 256	0#	0	0	0
口服免疫植物乳杆菌 TTFC	0	0	0.4 (0-2)	0
鼻内免疫植物乳杆菌 256	0	0	0	0
鼻内免疫植物乳杆菌 TTFC	48 (7-107)	195(156-233)	16 (4-31)	13 (5-27)

注：*在第 1-3 天，每组 16 只 C57Nl/6 小鼠用 5 x 10^9 植物乳杆菌 (植物乳杆菌 256 或植物乳杆菌 pLP503-TTFC 转化体)鼻内(i.n.)或口服免疫，然后在第 28-30 天同样加强免疫。在最后一次加强后 12 天或 21 天每组处死 8 只动物，并制备脾和颈淋巴结(CLN; 按每 2 只动物汇集)细胞悬浮液。通过 ELISPOT 测定 TT 特异性 Ig 生产细胞量。

#该数据按每 10^6 细胞的抗体分泌细胞(ASC)表示，代表 8 个脾样品或 4 个 CLN 样品的平均值(范围)，所述样品以三个平行孔测量。

在表 4 中，显示了根据 ELISPOT 确定的在脾或 CLN 中存在的

TT 特异性抗体分泌细胞(ASC)的数量。在用植物乳杆菌转化体鼻内免疫后，在最后一次加强后 12 天在鼻内免疫的小鼠的脾和 CLN 中发现大量 TT 特异性 ASC，到第 21 天时 ASC 细胞数降低。这些数据提示：小鼠的抗原特异性致敏局部出现在 CLN 水平上，并且系统性地出现在脾中。在口服免疫组中，测试的 8 份脾细胞悬浮液中有 2 份包含 TT 特异性 ASC，而在 CLN 中没有发现 ASC。

使用植物乳杆菌-pLP503-TTFC 研究小鼠鼻内免疫对抗原特异性 T 细胞的诱导。在第 1-3 天，用 5 x 10^9 植物乳杆菌 (植物乳杆菌 256 或植物乳杆菌 pLP503-TTFC 转化体)鼻内(i.n.)或口服免疫 C57BL/6 小鼠，然后在第 28-30 天同样加强免疫。在最后一次加强后 12 天(A & C)或 21 天(B & D)，每组处死 8 只动物，并制备脾(A & B)和 CLN(每 2 只动物汇集)(C & D)细胞悬浮液。在将每孔 3 x 10^5 脾细胞或 5 x 10^5 CLN 细胞与 TTFC、TT、TT 肽 P30 或仅培养基温育 72 小时后，检测细胞中的[^{3}H]胸苷掺入。在最后 18 小时，在所述培养物中加入[^{3}H]胸苷。结果表示为 SI，SI 如下计算：将细胞三个平行测试培养物的平均 cpm 除以仅接受缓冲液的培养物的平均 cpm。仅接受缓冲液的培养物的背景值为：A 220-760 cpm，B: 150-240 cpm，C 1000-4000 cpm 和 D 150-560 cpm。

在图 1 中，显示了脾或 CLN 的抗原特异性 T 细胞应答。在用植物乳杆菌 pLP503-TTFC 转化体鼻内免疫的小鼠中，在用 TTFC、TT 或 TT 肽 P30 再刺激后测量到增殖，这提示鼻内免疫最初通过局部淋巴结激活来诱导特异性免疫。在 BALB/c 小鼠中也获得了脾和 CLN 的抗原特异性 T 细胞应答。在从用野生型植物乳杆菌口服免疫或以同样途径免疫的小鼠获得的细胞中，没有观察到抗原特异性增殖(图 1)。

所述 pLP401-/503-质粒使得能够进行 TTFC 的定向(表面或细胞内)和可调节表达，其表达水平和效率是以前在乳杆菌属中没有达到过的。此外，在细胞内表达 TTFC 的植物乳杆菌 pLP503-TTFC 在鼻

内传递、第 1-3 天引发并在第 28-30 天加强后，显示具有很高的免疫原性。免疫原性在系统水平上，体现为高 TT 特异性 IgG 血清滴度，并且在粘膜水平上，体现为 BAL 液体中的 TT 特异性 IgA。此外，在脾的系统水平上以及在颈 LN 的局部水平上，都显示出 TT 特异性 ASC 和抗原特异性 T 细胞增殖。在口服传递植物乳杆菌-pLP503-TTFC 后，测量到中等滴度的 TT 特异性血清 IgG。干酪乳杆菌和植物乳杆菌菌株受到鼻道内存在的 M 样细胞的有效取样，并诱导了血清中的相当水平的免疫球蛋白。所述重组菌株间在 TTFC 表达水平、未降解 TTFC 的可维持水平以及在胃肠道中的持续性上的差异可能对于所述重组疫苗的效价有关键性的影响，并可解释为什么常常意外观测到植物乳杆菌菌株和干酪乳杆菌菌株之间的结果不同。

讨论

表达相当低水平表面暴露 TTFC 的植物乳杆菌 pLP401-TTFC 重组菌株在鼻内给予后是有免疫原性的，但是需要引发小鼠(在第 1-3 天)并随后加强两次(在第 28-30 天和第 49-51 天)，然后才能测量到抗原特异性应答。虽然 TTFC 的表面表达使 B 细胞表面存在的 Ig 能够直接结合，从而潜在增强免疫原性，但这种表面抗原表达可能特别容易受到粘膜免疫后疫苗载体所遇到的低 pH、胆汁酸或蛋白水解环境的影响。然而，有趣的是，如上文用植物乳杆菌 pLP401-TTFC 引发的小鼠在第 28-30 天用植物乳杆菌 pLP503-TTFC 转化体加强时，的确诱导了 TTFC 特异性血清 IgG(动力学比首次用于实验的小鼠的应答更迅速)。这项观察提示：小鼠的抗原特异性致敏实际上发生在给予用 pLP401-TTFC 转化的植物乳杆菌之后，虽然所述免疫应答的增强、成熟和可测量性由于各种原因而没有发生。这提示：为了最小化抗原降解并保证在免疫诱导位点保持能够利用足够的抗原，高水平的“稳定”表面表达可能不如增加细胞内抗原水平那么关键。

本研究在观察到鼻免疫后的免疫原性后，进一步地第一次证明

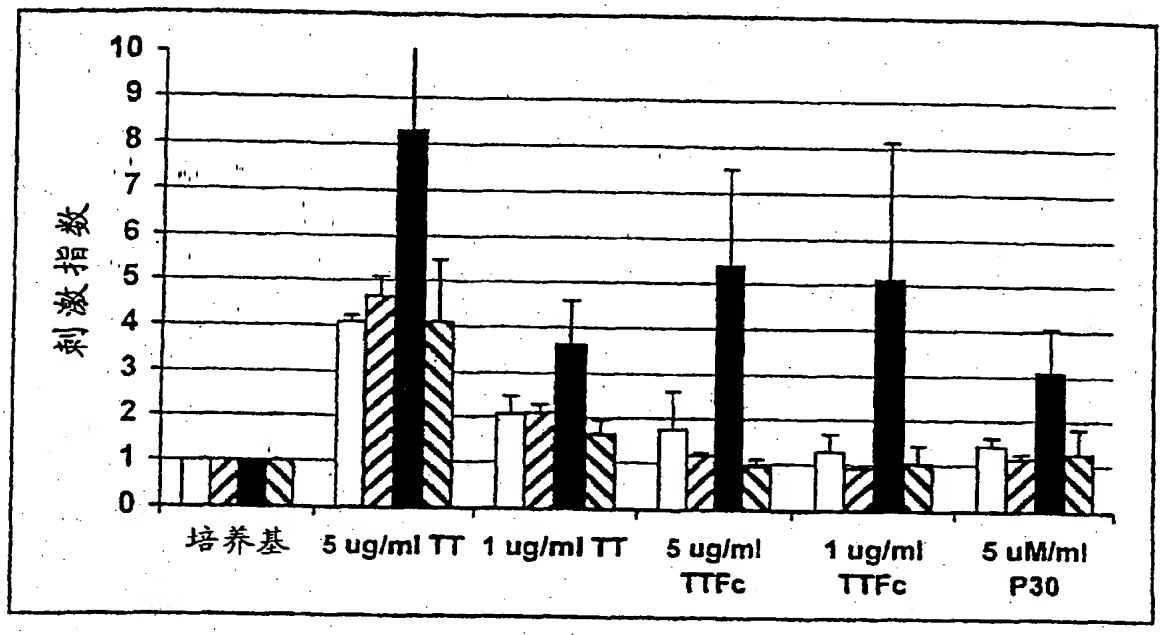
用细胞内表达 TTFC 的 5 x 10^9 植物乳杆菌口服免疫 C57BL/6 小鼠诱导了 TTFC 特异性血清 IgG 应答，这提供了对基于乳杆菌属的疫苗的重要支持。用干酪乳杆菌转化体(在细胞内表达 TTFC 或表达表面锚定的 TTFC)口服免疫 BALB/c 或 C57BL/6 小鼠结果相反。

由于干酪乳杆菌和植物乳杆菌在胃肠道内的持续时间不同，因此选择它们进行研究。在持续性上的差异可解释在免疫原性上的差异。

据认为可能有几种解释植物乳杆菌(细胞表面表达)结果的因素。首先，所述抗原在细胞表面的表达量比在细胞内的表达量低(几乎相差一个数量级)，因此可能存在剂量效应。此外，在肠腔内存在降解蛋白质的酶，因此细胞表面蛋白对于蛋白水解更容易受到影响。此外，所述蛋白质可能在细胞表面具有与等同的细胞内蛋白稍微不同的构象，另外这样的在细胞表面的抗原可能在细胞表面上改变活性，例如就附着而言。

所述的抗原传递载体强调了以下需要：确定宿主载体组合，并评估细胞活力、细胞数目、对粘膜的附着以及免疫系统的触发机制对于所述重组乳杆菌的免疫原性的影响。本发明首次证明了通过口服途径传递重组乳杆菌之后的 TTFC 免疫原性，这支持使用安全的基于乳杆菌属的口服新型疫苗来对抗例如目前每年记录到的 400,000 例破伤风死亡。

A 加强免疫后 12 天分离的脾细胞



B 加强免疫后 21 天分离的脾细胞

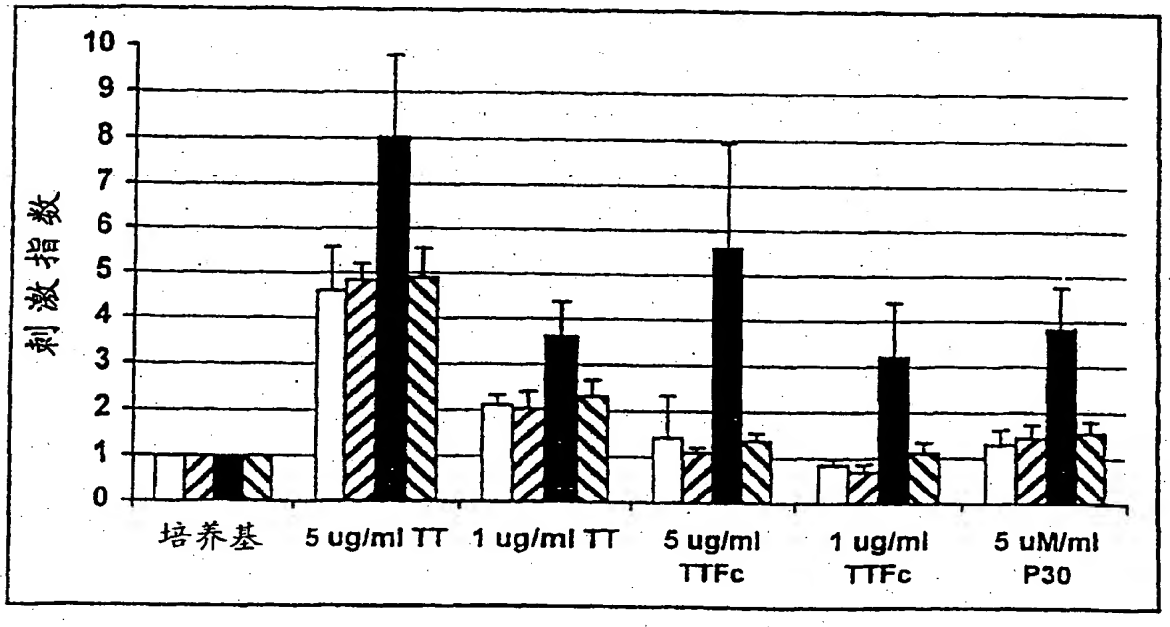
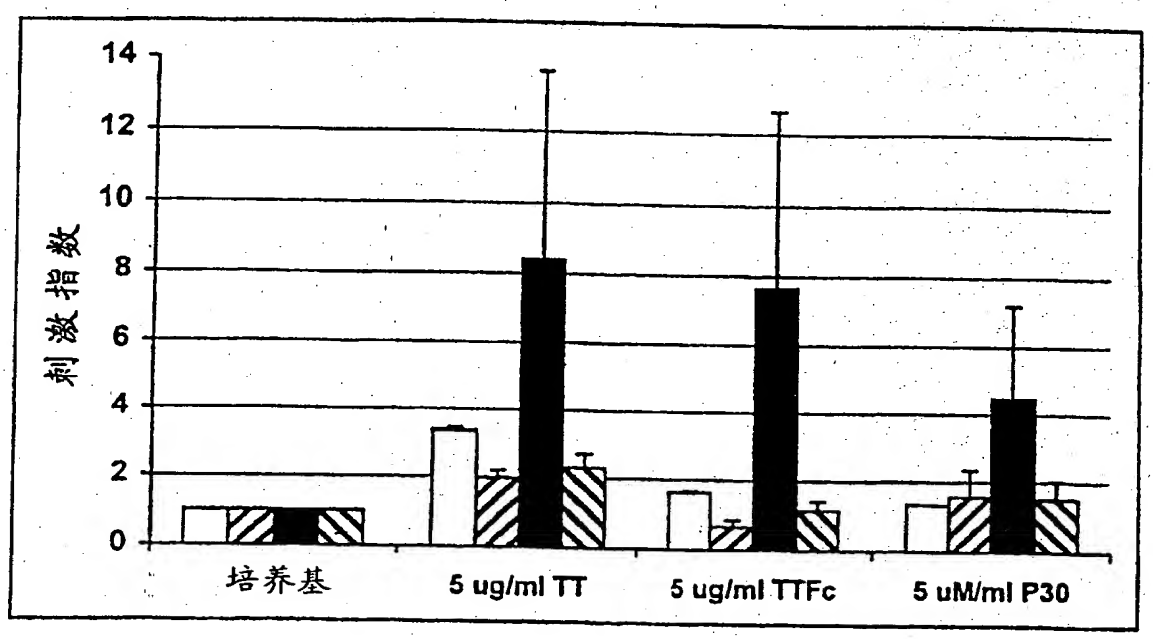


图 1

C 加强免疫后 12 天分离的 CLN 细胞



D 加强免疫后 21 天分离的 CLN 细胞

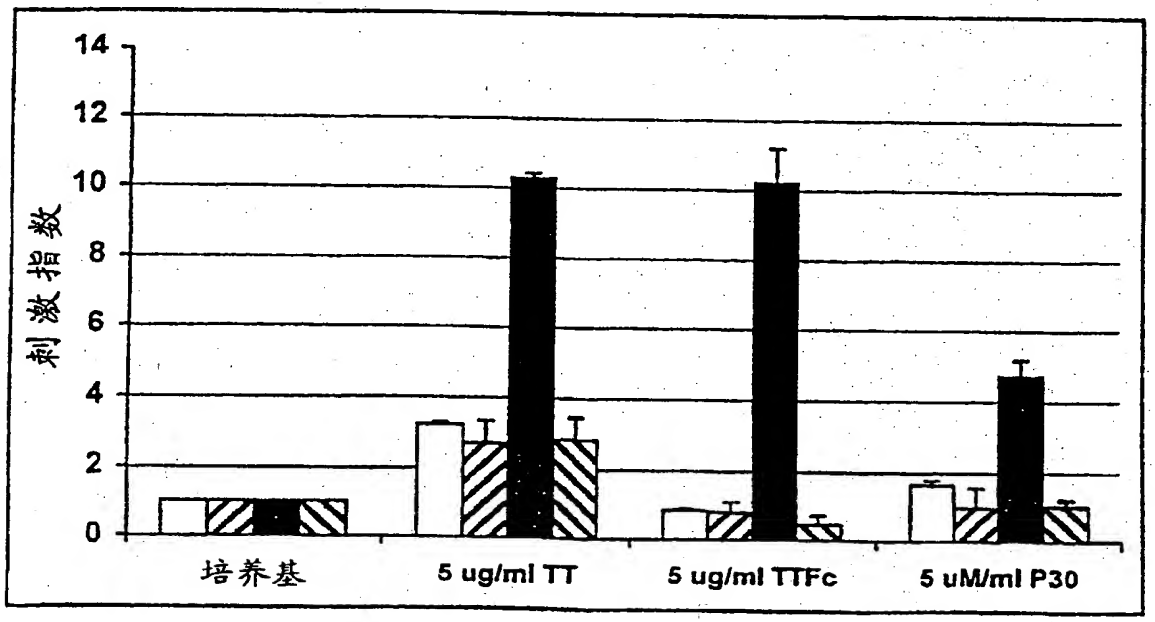


图 1